

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS ENZIMÁTICAS DE DIGESTIÓN *IN VITRO*
A LA VALORACIÓN NUTRITIVA DE PIENSOS DE CONEJOS.**

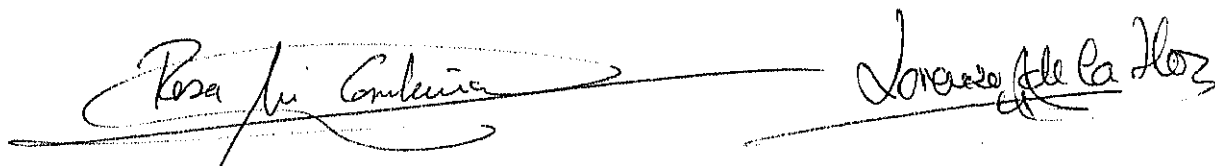
TESIS DOCTORAL

Vº Bº del director del trabajo.

Dra. Rosa Mª Carabaño Luengo

Vº Bº del tutor.

Dr. Lorenzo de la Hoz Perales

The block contains two handwritten signatures. On the left is the signature of Rosa Mª Carabaño Luengo, and on the right is the signature of Lorenzo de la Hoz Perales. Both signatures are written in dark ink and are positioned below their respective names.

Memoria presentada por la Lda. **María Antonia Ramos Talma**

para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 1995.

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR


Reunido el Tribunal examinador,
constituido por los miembros que suscri-
ben la presente Acta, el aspirante defen-
dió su Tesis doctoral, que había escrito
libremente sobre el siguiente tema:

APLICACION DE TECNICAS ENZIMATICAS DE
DIGESTION IN VITRO A LA VALORACION
NUTRITIVA DE PIENSOS PARA CONEJOS

Ha sido dirigida por:

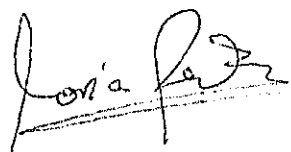

Terminada la lectura y contestadas
por el tesando las objeciones formula-
das por los Sres. Miembros del Tribunal,
éste calificó dicho trabajo con la nota de:

Madrid, 25 de ENERO de 1996
EL PRESIDENTE LOS VOCALES EL SECRETARIO

El Presidente



El Alumno

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS ENZIMÁTICAS DE DIGESTIÓN *IN VITRO*
A LA VALORACIÓN NUTRITIVA DE PIENSOS DE CONEJOS.**

TESIS DOCTORAL

María Antonia Ramos Talma

Madrid, 1995.

ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

Generales

cm	: centímetro
d	: día
g	: gramo
h	: hora
Kcal	: Kilocaloría
Kg	: Kilogramo
l	: litro
M	: Molaridad
Mcal	: Megacaloría
mg	: miligramo
Mj	: Megajulio
min	: minuto
ml	: mililitro
mm	: milímetro
mmol	: milimol
µm	: micrómetro
N	: Normalidad
TMR	: Tiempo Medio de Retención
TM	: Tiempo de retención en los compartimentos de Mezcla
TT	: Tiempo de Tránsito
U/ml	: unidades por mililitro
vs.	: versus
<	: menor que...
>	: mayor que...

Análisis químicos

AGV	: Ácidos Grasos Volátiles
EB	: Energía Bruta
ED	: Energía Digestible
EE	: Extracto Etéreo
ELN	: Extracto Libre de Nitrógeno
FAD	: Fibra Ácido-Detergente
FB	: Fibra Bruta
FND	: Fibra Neutro-Detergente

HEM	: Hemicelulosa Van Soest
LAD	: Lignina Ácido-Detergente
MO	: Materia Orgánica
MS	: Materia Seca
N	: Nitrógeno
NSP	: Non Starch polysacharydes (Polisacáridos no amiláceos)
PB	: Proteína Bruta
PD	: Proteína Digestible
sMS	: sobre Materia Seca
sMF	: sobre Materia Fresca

Términos de digestibilidad

dEB	: digestibilidad <i>in vivo</i> de la Energía Bruta
dFAD	: digestibilidad <i>in vivo</i> de la Fibra Ácido-Detergente
dFB	: digestibilidad <i>in vivo</i> de la Fibra Bruta
dFND	: digestibilidad <i>in vivo</i> de la Fibra Neutro-Detergente
dMO	: digestibilidad <i>in vivo</i> de la Materia Orgánica
dMS	: digestibilidad <i>in vivo</i> de la Materia Seca
dN	: digestibilidad <i>in vivo</i> del Nitrógeno
dPB	: digestibilidad <i>in vivo</i> de la Proteína Bruta
vFB123vi, vFB123ce, vFBno3, vFBnope:	digestibilidad <i>in vitro</i> de la FB con Viscozyme, Celulasa, sin tercer paso y sin pepsina/HCl, respectivamente
vFND123vi, vFND123ce, vFNDno3, vFNDnope:	digestibilidad <i>in vitro</i> de la FND con Viscozyme, Celulasa, sin tercer paso y sin pepsina/HCl, respectivamente

vMO123vi : digestibilidad *in vitro* de la MO con Viscozyme

vMS123vi, vMS123ce, vMSno3, vMSnope: digestibilidad *in vitro* de la MS con Viscozyme, Celulasa, sin tercer paso y sin pepsina/HCl, respectivamente

vN : digestibilidad *in vitro* del Nitrógeno

vPB123vi, vPBno3, vPBnope: digestibilidad *in vitro* de la PB con Viscozyme, sin tercer paso y sin pepsina/HCl, respectivamente

Términos estadísticos

CME : Cuadrado Medio del Error

CV : Coeficiente de Variación

Cv_r : Coeficiente de Variación de repetibilidad

CV_R : Coeficiente de Variación de Reproducibilidad

d.e. : desviación estándar

drs : desviación residual estándar

ECM : Error Cuadrático Medio

F : distribución F de Snédecor

IC : Intervalo de Confianza

n : número de datos

N.S. : no significativo

p : probabilidad

r : coeficiente de correlación

r : Índice de repetibilidad

R : Índice de Reproducibilidad

R² : coeficiente de determinación

SCE : Suma de Cuadrados del Error

S_F : desviación estándar de fiabilidad

S_r : desviación estándar de repetibilidad

S_R : desviación estándar de reproducibilidad

*** : p≤0,001 (altamente significativo)

** : p≤0,01 (muy significativo)

* : p≤0,05 (significativo)

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vi
SUMMARY	x
I. INTRODUCCIÓN.	
I.1. INTRODUCCIÓN.....	1
I.2. OBJETIVOS	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	
II.1. FISIOLÓGÍA DIGESTIVA DEL CONEJO.....	6
II.1.1. Introducción.....	6
II.1.2. Digestión en estómago e intestino delgado	6
II.1.2.1. Digestión enzimática del almidón.....	7
II.1.2.2. Digestión enzimática de la proteína	10
II.1.2.2.1. Pérdidas endógenas de Nitrógeno durante la digestión en monogástricos..	14
II.1.2.3. Digestión enzimática de la grasa.....	17
II.1.2.4. Digestión pre-cecal de la fibra.....	18
II.1.3. Digestión en el ciego. Fermentación microbiana	19
II.1.3.1. Actividad enzimática y microbiana del ciego	20
II.1.4. Velocidad de tránsito digestivo	24
II.1.4.1. Factores de variación.....	24
II.1.4.2. Tiempo de permanencia de los alimentos en los diferentes segmentos digestivos	28
II.1.5. Características y Producción de heces duras y blandas. Coprofagia	29
II.1.5.1. Formación y composición química de los dos tipos de heces.....	29
II.1.5.2. Producción e importancia nutritiva de las coprófagas. Efecto sobre la digestibilidad	32

II.2. PREDICCIÓN DEL VALOR NUTRITIVO DE ALIMENTOS EN MONOGÁSTRICOS	35
II.2.1. Introducción. Determinación de la digestibilidad <i>in vivo</i> . Inconvenientes que conducen a la predicción	35
II.2.2. Criterios de elección de una ecuación de predicción	37
II.2.2.1. Incidencia de los errores analíticos en la precisión de las ecuaciones	37
II.2.2.2. Índices de repetibilidad y de reproducibilidad	38
II.2.2.3. Robustez de un modelo de predicción.....	43
II.2.3. Predicción del valor nutritivo de los alimentos para conejos según su composición químico-bromatológica	43
II.2.3.1. Ecuaciones de predicción de la digestibilidad de la materia seca, de la materia orgánica y de la energía y de la energía digestible	43
II.2.3.2. Ecuaciones de predicción de la digestibilidad de la proteína	50
II.2.3.3. Ecuaciones de predicción de la digestibilidad de la fibra	50
II.2.4. Los métodos de digestión <i>in vitro</i> en monogástricos.....	51
II.2.4.1. Introducción y objetivos	51
II.2.4.2. Clasificación	52
II.2.4.3. Metodología de las técnicas multi-enzimáticas de digestión <i>in vitro</i> en monogástricos.....	54
II.2.4.4. Métodos <i>in vitro</i> de digestibilidad de la MS y MO, con enzimas endógenas (de estómago e intestino delgado). Ecuaciones de predicción de digestibilidad ileal o fecal de la MS, MO y energía para cerdos y aves	60
II.2.4.5. Métodos <i>in vitro</i> de digestibilidad de la MS y MO, con utilización de enzimas endógenas del animal y microorganismos o sus enzimas (hidrocarbonasas microbianas). Ecuaciones de predicción de digestibilidad fecal de la MS, MO y EB, para cerdos.....	65
II.2.4.6. Métodos <i>in vitro</i> de digestibilidad de la proteína, nitrógeno y aminoácidos, con enzimas endógenas de estómago e intestino delgado. Ecuaciones de predicción de digestibilidad ileal o fecal de la PB, PD, N y aminoácidos, para cerdos	71
II.2.4.7. Métodos de digestibilidad <i>in vitro</i> para determinar el valor nutritivo de los alimentos para conejos	77

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

III.1. DIETAS UTILIZADAS	83
--------------------------------	----

III.2. ENSAYOS DE DIGESTIBILIDAD <i>IN VIVO</i>	89
III.3. TÉCNICAS DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	93
III.3.1. Técnicas de tres pasos	93
III.3.2. Técnicas de dos pasos	96
III.3.2.1. Técnica sin pepsina/HCl	96
III.3.2.2. Técnica sin tercer paso	97
III.3.3. Cálculos de digestibilidad <i>in vitro</i> de los distintos nutrientes	97
III.3.3.1. Cálculo de la digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca y de la materia orgánica	97
III.3.3.2. Cálculo de la digestibilidad <i>in vitro</i> de la proteína bruta	98
III.3.3.3. Cálculo de la digestibilidad <i>in vitro</i> de las fracciones fibrosas de la pared celular: fibra bruta y fibra neutro-detergente	98
III.3.4. Preparación de reactivos	99
III.3.5. Complejos enzimáticos utilizados	100
III.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS UTILIZADAS	102
III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103
III.5.1. Regresión entre digestibilidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	104
III.5.2. Cálculo del índice de repetibilidad	106
III.5.3. Cálculo del índice de fiabilidad	107
III.5.4. Comparación de líneas de regresión	107
III.5.5. Validación de modelos de regresión	108
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
IV.1. ESTANDARIZACIÓN LABORATORIAL DE UN MÉTODO DE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i>	111
IV.1.1. Técnica de digestión <i>in vitro</i> de 3 pasos con Viscozyme en el tercer paso	111
IV.1.2. Técnica de digestión <i>in vitro</i> de 3 pasos con Celulasa en el tercer paso. Efecto de la sustitución de Viscozyme por Celulasa	123
IV.1.3. Efecto de la supresión del tercer paso en la técnica de digestión <i>in vitro</i>	128
IV.1.4. Efecto de la eliminación de la incubación con pepsina/HCl en la técnica de digestión <i>in vitro</i>	132
IV.1.5. Comparación global entre los métodos <i>in vitro</i> estudiados	136
IV.2. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE LA ECUACIÓN PROPUESTA EN LA PREDICCIÓN DEL VALOR NUTRITIVO DE DIETAS CON NIVELES ALTOS DE PULPA DE REMOLACHA O DE GRASA	137

IV.3. PREDICCIÓN SEGÚN PARÁMETROS QUÍMICOS DE LA PARED CELULAR.....	139
IV.4. ÍNDICES DE REPETIBILIDAD Y DE FIABILIDAD	143
IV.5. INCIDENCIA DE LOS ERRORES ANALÍTICOS DE LA VARIABLE REGRESORA EN LA PRECISIÓN DE LAS ECUACIONES DE PREDICCIÓN.....	146
IV.6. VALIDACIÓN DE MODELOS DE REGRESIÓN	149
IV.6.1. Análisis del comportamiento de la ecuación propuesta en esta tesis en la predicción del valor nutritivo de dietas valoradas <i>in vivo</i> en otros laboratorios.....	149
IV.6.2. Validación con datos independientes	154
V. CONCLUSIONES	159
VI. BIBLIOGRAFÍA	161

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

- De forma especial a Rosa Carabaño, por el interés con que ha dirigido esta tesis, por su constante colaboración y siempre oportuna ayuda, por su carácter estimulante y apacible a la vez, por su amistad.
- A todas las personas del Departamento de Alimentación Animal de la E.T.S.I. Agrónomos de la U.P.M, que de una forma u otra forma han compartido conmigo el trabajo de estos años. Gracias a todos y a todas por vuestra buena compañía.
- A Lorenzo de la Hoz, por ser el nexo entre Veterinaria y Agrónomos, y por impulsarme a hacer el doctorado.
- A Pilar Muñoz, por su inestimable ayuda en la realización de los análisis químicos.
- A Joaquín Fuentes-Pila, por sus valiosas sugerencias estadísticas.
- A M^a Jesus Villamide, por la lectura crítica del borrador final de esta tesis.
- A Antonio, por su apoyo y comprensión en todo momento, que han hecho más fácil el avance diario de esta tesis.

RESUMEN

El presente trabajo propone un nuevo método de valoración de alimentos para conejos. Para ello, se han desarrollado las bases de una técnica multi-enzimática de digestión *in vitro* que, simulando la fisiología digestiva del conejo, permita predecir el valor nutritivo de los piensos comerciales de conejos. Se han comparado los valores obtenidos de digestibilidad *in vitro* de distintos nutrientes con sus correspondientes valores de digestibilidad total *in vivo* y se han obtenido las relaciones existentes entre ellos.

Se valoraron *in vivo* 27 piensos comerciales y experimentales de conejos. Los piensos experimentales se seleccionaron de tal forma que, sin desviarse mucho de los rangos de proteína y de fibra normalmente presentes en los piensos comerciales, contribuyeran a aumentar los rangos de digestibilidad de la MS y de la EB y de fibra del conjunto total de piensos.

Los ensayos de digestibilidad *in vivo* se llevaron a cabo con un periodo de adaptación de 7 días seguido de un doble periodo de control de la ingestión y de colecta de heces de 2 x 4 días, durante dos semanas consecutivas. Tras los análisis químicos de pienso y heces se calcularon los coeficientes de digestibilidad total de los distintos nutrientes.

Los piensos así valorados se utilizaron como sustratos para los ensayos de digestión *in vitro*. Cada pienso se molió con una criba de 1 mm, se pesó 1 g (sMS) y se analizó por duplicado. La técnica de digestión *in vitro* de referencia consta de tres pasos o incubaciones sucesivas con enzimas comerciales: los dos primeros simulan la digestión en el estómago e intestino delgado utilizando pepsina en medio ácido y pancreatina en medio alcalino, y el tercero reproduce la fermentación cecal mediante el empleo de un complejo enzimático microbiano con capacidad para degradar la fibra potencialmente fermentescible, Viscozyme. Se probaron, además, técnicas alternativas como la utilización de Celulasa en el tercer paso o la supresión de la primera o la tercera fases de incubación.

En ambas técnicas de tres pasos así como cuando no se incluía el primer paso, se obtuvieron valores de digestibilidad *in vitro* de la MS significativamente mayores

($p < 0,0001$) que sus correspondientes valores de digestibilidad total. Por el contrario, estos valores fueron menores ($p < 0,0001$) al suprimir el tercer paso, sugiriendo la importancia de la fermentación microbiana en el ciego del conejo. Por consiguiente, la primera conclusión que se puede extraer es que estas técnicas *in vitro* no reproducen exactamente el proceso fisiológico de la digestión del conejo. Esto, sin embargo, no debe invalidarlas ya que antes es necesario estudiar cómo se comportan en la predicción del valor nutritivo de los piensos, lo que constituye siempre uno de los objetivos de los métodos *in vitro*.

Para las cuatro técnicas ensayadas se obtuvieron las ecuaciones de regresión entre los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS, MO, PB y FB y los valores de digestibilidad *in vivo* de la MS, EB, PB y FB, así como con la ED.

En todos los casos se obtuvieron regresiones significativas ($p < 0,001$) entre las digestibilidades *in vitro* e *in vivo* de la MS, obteniéndose la mejor predicción con el método de referencia ($R^2 = 0,84$, $drs = 1,45$). Con las técnicas alternativas se obtuvieron siempre peores estimaciones ($R^2 < 0,76$, $drs > 1,78$). Por tanto, el método de referencia (pepsina/pancreatina/Viscozyme) sirvió como base para futuras comparaciones.

La estimación de la ED y de la digestibilidad de la EB era siempre peor ($R^2 = 0,55$ y $R^2 = 0,64$, respectivamente, para el método de referencia). Esto puede ser debido, en parte, a la baja correlación encontrada en este trabajo entre la digestibilidad de la MS y la de la EB ($R^2 = 0,89$), y entre la digestibilidad de la MS y la ED ($R^2 = 0,77$).

Las correlaciones obtenidas para la PB y para la FB fueron $R^2 = 0,19$, $drs = 2,35$ y $R^2 = 0,50$, $drs = 4,73$, respectivamente, en el método de referencia; siendo con frecuencia no significativas ($p > 0,05$) en los métodos alternativos. Esto indica que la digestibilidad de estos nutrientes no se puede predecir mediante estos métodos.

Las ecuaciones obtenidas se compararon con las ecuaciones de predicción de la digestibilidad de la MS basadas en parámetros químicos de la pared celular de las mismas dietas. La bondad de las predicciones se valoró teniendo en cuenta no sólo el mejor ajuste, sino también los índices de repetibilidad y de fiabilidad de los parámetros

predictores en nuestro laboratorio, así como la incidencia de los errores analíticos de las variables explicativas en la precisión de las ecuaciones.

Las correlaciones, al utilizar FAD o FB como variables independientes en una ecuación de regresión simple, fueron $R^2=0,49$, $drs=2,57$ y $R^2=0,32$, $drs=2,96$, respectivamente. Por consiguiente, en este trabajo se obtienen mejores predicciones con la técnica de digestión *in vitro* que con parámetros de fibra. No obstante, la inclusión de uno de estos parámetros junto con los valores de digestibilidad *in vitro*, como variable independiente en un análisis de regresión múltiple, mejoró la precisión.

La técnica *in vitro* de referencia ha demostrado ser más repetible que los análisis de FB o de FAD ($CV_r=0,69\%$ vs. $CV_r=1,78\%$ y $CV_r=1,72\%$, respectivamente); y también más fiable ($CV_F=1,77\%$ vs. $CV_F=4,26\%$ y $CV_F=7,87\%$, respectivamente).

Por otra parte, la técnica es capaz de predecir el valor nutritivo de piensos que presentan niveles importantes de materias primas altamente digestibles como pulpa de remolacha (10-50%) o grasa (3-6%) en su composición. Esto se ha deducido valorando *in vitro* 14 dietas más de estas características y comprobando que la ecuación obtenida con ellas no difiere significativamente de la ecuación originaria de 27 datos. Por consiguiente, se puede proponer una ecuación de predicción resultante de considerar 41 dietas (27+14). Este tipo de piensos no se pueden estimar mediante parámetros químicos debido a las interacciones que, sin duda, tienen lugar entre los citados ingredientes y la fisiología digestiva del animal.

Las principales ecuaciones de predicción obtenidas con el método de referencia se validaron con datos independientes, es decir con parejas de valores de las variables dependiente e independiente que no habían servido para elaborar los modelos. Para ello se utilizaron 92 muestras de piensos de conocida digestibilidad *in vivo* procedentes de cuatro países europeos (Bélgica, Francia, Italia y Portugal). Los análisis de digestibilidad *in vitro* de estos piensos se realizaron en nuestro laboratorio. Las ecuaciones resultaron robustas (errores de predicción menores del 5% en todos los conjuntos de datos), indicando su alta capacidad predictora. Se validaron asimismo algunas de las principales ecuaciones de predicción de digestibilidad de la energía

con parámetros químicos (FAD, FB), de uso común en la práctica. Estas ecuaciones también han resultado robustas, aunque no tanto como las obtenidas en este trabajo. A la luz de estos resultados, nuestras ecuaciones se pueden proponer como una alternativa a las ecuaciones ya existentes en la bibliografía y así constituir una opción más a la hora de elegir una ecuación para predecir el valor nutritivo de un pienso para conejos.

Los resultados del presente trabajo sugieren que el método *in vitro* propuesto puede ser adecuado para estimar el valor nutritivo (digestibilidad de la MS, digestibilidad de la EB y contenido en ED) de piensos comerciales para conejos. Presenta, además, un interés potencial para la valoración de alimentos pues se trata de un método sencillo (sin dificultades técnicas), preciso, repetible, fiable, barato y relativamente rápido, que puede ser utilizado de forma rutinaria en un laboratorio de alimentación animal. No obstante, es necesario llevar a cabo un estudio interlaboratorial del método para corroborar su validez antes de ser recomendado para su utilización práctica.

SUMMARY

An *in vitro* method for feed evaluation in rabbits, using a multi-enzyme system was developed. The *in vitro* digestibility values of nutrients were compared to their corresponding *in vivo* fecal digestibility values and the relationships between them were obtained.

In vivo digestibility trials were conducted on 27 complete diets including commercial and experimental diets. Experimental diets were chosen in order to enlarge the digestibility and the fiber ranges of commercial diets.

After a 7-day adaptation period, the measurement of the daily feed intake and collection of feces were made during a 2 x 4-days trial along a period of two weeks. After chemical analysis of diets and feces, calculations were made to obtain the fecal digestibility coefficients.

The diets from the *in vivo* studies were used as substrates for the *in vitro* enzymatic digestion studies. Duplicate samples (1 g DM basis) from each diet ground to pass a 1 mm mesh mill were used. The reference *in vitro* technique was based on three consecutive incubation steps with commercially available enzymes: the first two steps simulate digestion in stomach and small intestine by using pepsin in acid medium and pancreatin in alkaline medium, and the third step reproduces cecal fermentation by means of a microbial fibre-degrading enzyme mixture: Viscozyme. Alternatives to this technique, such as using Cellulase in the third step or omitting the first or the third incubation, were also tested.

Values of *in vitro* digestibility of DM were significantly higher ($p < 0.0001$) than corresponding values of fecal DM digestibility in both three steps techniques and when the first step was not included. On the contrary, these values were lower ($p < 0.0001$) when the third step was omitted, suggesting the importance of microbial fermentation in the rabbit cecum. Therefore, these *in vitro* techniques do not fully simulate the physiological process of digestion that takes place in the rabbit.

The regression equations between *in vitro* digestibilities of DM, OM, CP and CF and *in vivo* digestibilities of DM, GE, CP and CF, as well as DE were derived for the four methods.

Accurate predictions ($p < 0.001$) of *in vivo* dry matter digestibility were obtained in all cases with *in vitro* dry matter digestibility, and the best fit was obtained for the reference method ($R^2 = 0.84$, $rsd = 1.45$). The alternative techniques gave worse estimations ($R^2 < 0.76$, $rsd > 1.78$). Therefore, all comparisons were made in relation to this reference method (pepsin/pancreatin/Viscozyme).

The prediction of GE digestibility or DE was always less accurate ($R^2 = 0.64$ and $R^2 = 0.55$, respectively, for the reference method). This may partly be due to the low correlation found in this work between DM digestibility and GE digestibility ($R^2 = 0.89$) and between DM digestibility and DE ($R^2 = 0.77$).

The correlations for CP and CF were $R^2 = 0.19$, $rsd = 2.35$ and $R^2 = 0.50$, $rsd = 4.73$, respectively, for the reference method; and were frequently not significant ($p > 0.05$) in the alternative methods, indicating that the digestibility of these nutrients cannot be predicted by means of these methods.

The regression equations obtained were compared with prediction equations based on cell-wall parameters of the same diets. The accuracy of predictions was assessed taking into account not only the best fit, but also the repeatability and reliability of the regressors in our laboratory as well as the incidence of analytical errors of the independent variable in this accuracy.

The correlations obtained were $R^2 = 0.49$, $rsd = 2.57$ and $R^2 = 0.32$, $rsd = 2.96$, when ADF or CF were used, respectively. Therefore, the *in vitro* technique gave better predictions than chemical parameters in this study. However, the inclusion of one of these parameters as an independent variable in a multiple regression analysis, together with *in vitro* values, improved the accuracy.

On the other hand, the *in vitro* technique has proved to be more repeatable than CF or ADF analysis ($VC = 0.69\%$ vs. $VC = 1.78\%$ and $VC = 1.72\%$, respectively); and also more reliable ($VC = 1.77\%$ vs. $VC = 4.26\%$ and $VC = 7.87\%$, respectively).

The reference *in vitro* method has proved to be able to predict the nutritive value of diets presenting important levels of high digestible ingredients such as beetroot pulp (10-50%) or fat (3-6%). This has been verified using 14 more diets to check that the

equation obtained with them does not differ significantly from the original equation based on 27 data. As a consequence, a prediction equation considering 41 diets (27+14) can now be proposed. These type of diets cannot be estimated by means of cell wall parameters due to the interactions that certainly take place between such raw materials and the digestive physiology.

The main prediction equations obtained with the reference method were validated using 92 samples of diets with known *in vivo* digestibility from four independent data sets of four european countries (Belgium, France, Italy and Portugal). Equations proved to be robust (prediction errors less than 5% in all data sets), indicating their good predictive capacity. Some of the main prediction equations of GE digestibility from ADF or CF, found in the literature, were also validated. These equations, that are commonly used in practice, have also proved to be robust, although not as much as the equations obtained in this work. Accordingly, our equations can be proposed as an alternative to existing equations based on chemical parameters to predict the nutritive value of diets for rabbits.

In conclusion, the results of the present study suggest that the proposed *in vitro* method may be suitable for estimating the nutritive value (DM digestibility, GE digestibility and DE content) of commercial diets for rabbits. It seems to have a significant potential for feed evaluation, for it is a simple (without technical difficulties), accurate, repeatable, reliable, cheap and relatively quick method to be used in routine laboratory applications. Nevertheless interlaboratory testing of this method is required to support its validity before it can be recommended for practical purposes.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN.

En la producción de carne de conejo, el coste de la alimentación supone aproximadamente el 70% del coste total, de forma similar a lo que ocurre en cualquier otro sistema de producción ganadera en régimen intensivo. Por ello, cualquier actuación en este campo de la alimentación tendrá una incidencia muy grande sobre el rendimiento de las explotaciones cunícolas.

Para poder suministrar las dietas adecuadas y conseguir buenos rendimientos productivos es necesario conocer, por un lado, las necesidades nutritivas del animal, y por otro, el valor nutritivo de las distintas materias primas y piensos compuestos.

Las necesidades nutritivas se describen definiendo unos intervalos óptimos de concentración energética, proteica, etc., dentro de los cuales los niveles de producción se mantienen altos.

Por otro lado, el valor nutritivo de los alimentos es función de su concentración en principios inmediatos y de su utilización digestiva y metabólica.

En esta tesis doctoral se tratarán cuestiones relativas a la valoración nutritiva de los alimentos para conejos, y no se hablará de las necesidades nutritivas de esta especie.

La mejor forma de determinar el valor nutritivo de un alimento consiste en analizar de manera directa los coeficientes de digestibilidad de sus nutrientes mediante ensayos de digestibilidad *in vivo*. Sin embargo, estos ensayos resultan en muchos casos poco prácticos o inviables para ser utilizados de manera rutinaria por la industria de fabricación de piensos (debido al tiempo y al coste económico que conllevan), y no se pueden realizar para cada pienso que se fabrique. Por ello resulta de gran interés el desarrollo de nuevos métodos que permitan estimar de un modo sencillo, rápido y poco costoso este valor nutritivo, en base a determinaciones más sencillas.

En la actualidad ya existen ecuaciones de predicción del valor energético, para dietas de conejo, basadas en los constituyentes de la pared de la célula vegetal, por ser éstos los que más condicionan la digestibilidad de la energía del alimento.

Los métodos enzimáticos de digestión *in vitro* que tratan de reproducir el proceso de la digestión podrían ser una alternativa. Estos métodos ya han sido contrastados en otras especies monogástricas (cerdos y aves) obteniéndose altas correlaciones con las digestibilidades *in vivo* y, por tanto, buenas predicciones, pero la posibilidad de aplicarlos a alimentos para conejos no se había estudiado hasta el momento.

La utilidad de los métodos de digestión *in vitro* se puede contemplar desde dos puntos de vista. Por un lado, a las empresas de fabricación de piensos les supone un importante ahorro de tiempo disponer de un sistema de laboratorio eficaz y rápido para determinar los coeficientes de digestibilidad de los nutrientes (el valor nutritivo) de las raciones que van a suministrar al ganadero, en lugar de tener que hacer ensayos de digestibilidad *in vivo*. Por eso surge la necesidad de predicción del valor nutritivo por métodos exclusivamente de laboratorio. Por otro lado, en investigación científica es muy ventajoso poder hacer una simulación aproximada en el laboratorio de los distintos pasos de la digestión del conejo. Por todo ello, la digestión *in vitro* se constituye en un sistema nuevo de valoración de alimentos.

En el presente trabajo de tesis doctoral se estudia la aplicación de los métodos enzimáticos de digestión *in vitro* que acabamos de comentar a la valoración de alimentos para conejos.

La tesis se compone de seis apartados, el primero de los cuales comprende esta introducción y plantea los objetivos así como las hipótesis que se van a contrastar. Seguidamente, se hace una revisión bibliográfica (apartado II) que incluye dos epígrafes: en el epígrafe II.1. se describe la fisiología digestiva del conejo, estableciendo las funciones de los diversos compartimentos (estómago, intestino delgado, ciego) en la digestión y las relaciones entre ellos; con ello se persigue obtener una idea clara de lo que se pretende reproducir en el laboratorio; en el II.2. se exponen los métodos de predicción del valor nutritivo de alimentos en monogástricos. En primer lugar se revisan las principales ecuaciones de predicción en base a

parámetros químicos de la dieta, existentes en conejos, y a continuación se recopilan, discuten y evalúan los principales trabajos que presenta la bibliografía sobre métodos de digestión *in vitro*, en monogástricos. Se da particular énfasis a los existentes en cerdos y en aves, por ser mucho más numerosos que en conejos. Al revisar las distintas técnicas, se presta mayor atención a aquellas que sean más sencillas, rápidas y reproducibles, y la validez de las mismas se basa en el grado de relación existente entre los resultados *in vitro* e *in vivo* para idénticos alimentos. A continuación, el apartado III describe el material y métodos utilizados, tanto en la fase experimental como en la de análisis de datos y de resultados; el apartado IV expone los resultados obtenidos y su correspondiente discusión; en el apartado V se plasman las principales conclusiones de la tesis; y el apartado VI y último, presenta las referencias bibliográficas consultadas.

I.2. OBJETIVOS.

Dada la dificultad y el coste económico que conlleva la realización de ensayos de digestibilidad *in vivo* y dadas las limitaciones que presentan los métodos de predicción según parámetros químicos, la presente investigación se plantea como **objetivo principal** obtener un sistema nuevo y sencillo, adecuado para predecir el valor nutritivo de los piensos para conejos en crecimiento. Se trata de desarrollar las bases de una técnica de digestión enzimática *in vitro* estandarizando una metodología de laboratorio. Luego se contrasta el método desarrollado mediante la comparación directa de los resultados de digestibilidad obtenidos *in vitro* e *in vivo*, para la materia seca (MS), materia orgánica (MO), energía bruta (EB), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB) y fibra neutro detergente (FND) y para la energía digestible (ED), y se obtienen ecuaciones de predicción. Se busca un método sencillo, preciso, fiable, rápido y barato.

Un **segundo objetivo** consiste en comparar las predicciones obtenidas según los valores de digestibilidad *in vitro* y según parámetros químicos. Esta comparación la

haremos no sólo mediante la bondad de la predicción del modelo, sino también cuantificando los índices de repetibilidad y de fiabilidad de los parámetros predictores en nuestro laboratorio, así como la incidencia de los errores analíticos de las variables regresoras en la precisión de las ecuaciones.

Una vez planteados los dos objetivos citados, comprobaremos si los métodos *in vitro* propuestos son adecuados para predecir el valor nutritivo de piensos que incluyen en su composición materias primas que los métodos químicos no predicen bien (fibras altamente digestibles y grasas).

Como **tercer objetivo** validaremos la capacidad predictora de las principales ecuaciones de predicción que se obtengan en esta tesis frente a valores que no han formado parte en la elaboración de las mismas. También validaremos algunas de las ecuaciones de predicción del valor nutritivo de piensos para conejos según parámetros químicos de la pared celular ya existentes en la bibliografía. De esta manera podremos concluir si las ecuaciones obtenidas sirven para la predicción, y en consecuencia recomendar su utilización, o si por el contrario no resultan válidas para dicho fin.

Las hipótesis que se contrastan son las siguientes:

- 1.- El proceso digestivo del conejo se puede reproducir *in vitro* de una forma aproximada utilizando una metodología sencilla de laboratorio y obtener así valores de digestibilidad de los distintos nutrientes similares a los de digestibilidad *in vivo*.
- 2.- Los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS y de la MO de piensos de conejos están altamente correlacionados con los obtenidos mediante pruebas de digestibilidad *in vivo*. Por consiguiente, los métodos *in vitro* sirven para predecir la digestibilidad de la MS, de la MO, de la EB y la ED de los piensos de conejos.
- 3.- Los métodos *in vitro* sirven para predecir la digestibilidad de la PB y de la FB de los piensos de conejos.

4.- Los valores de digestibilidad *in vitro* son mejores predictores del valor nutritivo que los parámetros de fibra de la pared celular: FAD y FB. Además son capaces de predecir el valor nutritivo de algunos tipos de alimentos -fibras altamente digestibles, grasas- cuya predicción no consiguen los parámetros químicos.

5.- Las ecuaciones basadas en valores de digestibilidad *in vitro*, pueden ser utilizadas para predecir ya que se muestran robustas en la validación con datos independientes. En consecuencia se puede recomendar su uso en la práctica.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. FISIOLÓGÍA DIGESTIVA DEL CONEJO

II.1.1. Introducción.

El conejo es un animal hervívoro y por tanto adaptado para consumir alimentos de bajo valor nutritivo, es decir de baja concentración energética y escaso contenido en nutrientes. Por otro lado, es una especie de alta productividad, tanto en crecimiento como en rendimiento productivo, lo que hace que tenga altas necesidades metabólicas.

Esta disyuntiva la soluciona el conejo mediante la particular fisiología digestiva de que dispone. En primer lugar, las características de su aparato digestivo, cuyo estómago representa el 40% del volumen total del mismo (Cheeke, 1987), le permiten una ingestión elevada de alimentos. En segundo lugar, presenta normalmente un rápido tránsito de la digesta, lo que le permite también tener una mayor ingestión. En tercer lugar, dispone de un mecanismo de separación de partículas de tal forma que las de mayor tamaño se eliminan rápidamente, mientras que las menores junto con las sustancias solubles entran en el ciego en el que permanecen y tiene lugar la fermentación microbiana. De esta manera sólo se retiene en el aparato digestivo la parte de la digesta que ocupa menos volumen, y que resulta ser además la más nutritiva, permitiendo que el animal siga ingiriendo alimento. Por último, el conejo es una especie que realiza coprofagia, es decir que reingiere parte de sus heces, las heces blandas, cecotrofas o coprófagas, que son de origen cecal. De esta manera se produce el reciclado de los productos de la fermentación microbiana en el ciego, lo que supone un aporte nutritivo extra para el animal.

Existen dos tipos de digestión en el tracto digestivo del conejo: la digestión enzimática en el estómago e intestino delgado y la digestión fermentativa en el ciego.

II.1.2. Digestión en estómago e intestino delgado (digestión pre-cecal).

La digestión enzimática de los nutrientes tiene lugar a lo largo del tracto digestivo antes de llegar al ciego y se produce gracias a las distintas secreciones

enzimáticas que se vierten en los diferentes compartimentos del tubo digestivo. Así se hidrolizan los principios inmediatos del alimento de modo que los nutrientes más sencillos puedan ser absorbidos a través de la pared intestinal. Para que el proceso digestivo se realice con garantías nutritivas se necesita además un tiempo de tránsito adecuado de la digesta que permita la correcta actuación de las enzimas sobre los sustratos.

Cada componente nutritivo del alimento sufre una degradación distinta en el estómago e intestino delgado.

II.1.2.1. Digestión enzimática del almidón.

En el caso del almidón, se ha demostrado cierta actividad amilásica en el **estómago** debida a las amilasas salivar, alimenticia (aportada por la leche materna y por los cereales) y microbiana (microorganismos del ciego ingeridos con las cecotrofas), según apunta Blas (1986). La importancia cuantitativa de estas amilasas es desconocida, y probablemente escasa, en los animales adultos, debido al pH desfavorable de su estómago ($\text{pH}=1-2$). Sin embargo, no todas las regiones del estómago presentan el mismo pH; así, en la región fúndica hay glándulas tubulares de secreción neutra que aumentan el pH hasta valores de 3 (More *et al.*, 1971), permitiendo así cierta actividad amilásica. Asimismo, se ha observado que el pH del fundus aumenta considerablemente con la llegada de las cecotrofas (alcanzándose valores de 4-5), probablemente como consecuencia de la liberación de tampón fosfato por parte de las mismas (Griffiths y Davies, 1963).

Por otra parte, en los animales jóvenes (gazapos de menos de 6 semanas), cuyo estómago presenta un pH menos ácido (3-4), la actividad amilásica podría tener alguna importancia a nivel gástrico.

Las distintas amilasas soportan el pH ácido de distinta forma y en general las de origen microbiano y alimentario toleran mejor la acidez que la salivar. Así, la amilasa salivar a pH 5 sólo conserva un 30% de actividad, mientras que la procedente de las cecotrofas (amilasa microbiana) aún conserva cerca del 90% de su actividad a este

pH, el 70% a pH 4.5 y aún el 30% a pH 4 (Griffith y Davies, 1963). Blas (1986) encuentra que el rango de pH que permite la actuación de la amilasa salivar es muy estrecho y está situado alrededor de la neutralidad y que esta enzima no tiene prácticamente actividad a pH 5. También indica que la amilasa microbiana, que también actúa de forma óptima a pH próximos a la neutralidad, sigue siendo bastante activa a pH 5,1 e incluso a pH 4,1 y 3,2. Además se trata de una amilasa francamente estable en medio ácido, ya que mantiene más del 70% de su actividad tras 2 h de exposición a pH 5,1; más del 50% si el pH es de 4,1 y casi el 40% si el pH es de 3,2.

No obstante, se asume que la mayor parte del almidón pasa al **intestino delgado** sin haber sido degradado, y es allí donde la amilasa pancreática y las glucosidasas de la mucosa intestinal (sacarasas, maltasas y lactasas) encuentran un pH próximo a la neutralidad, idóneo para desarrollar su actividad. Este conjunto enzimático degrada el almidón a glucosa, la cual puede ser absorbida directamente y a continuación metabolizada por las enzimas catalizadoras de la glucosa, o fermentada por la microflora digestiva dando lugar a ácidos grasos volátiles que serán absorbidos. Se acepta que el almidón es casi completamente digerido y transformado en glucosa antes de su llegada a la válvula ileocecocólica. En consecuencia, la cantidad de almidón o hidratos de carbono intermedios que puede ser objeto de fermentaciones microbianas en el ciego es presumiblemente muy pequeña.

Son relativamente pocos los trabajos que estudian la **digestibilidad ileal del almidón** de piensos comerciales. Según Wolter *et al.* (1980) es de un 85%, y según Merino y Carabaño (1992) de un 98-99%, en animales adultos. No hay datos de digestibilidad ileal del almidón en animales jóvenes. Se encuentran, sin embargo, más trabajos que miden la concentración de almidón en el íleon terminal, dando con ello una idea de la digestión de este nutriente. Factores como la edad del animal o la dieta pueden influir en la digestión del almidón.

En cuanto a la edad, aunque la amilasa pancreática existe ya desde el nacimiento, tiene muy poca actividad hasta los 21 d; a continuación tiene lugar un rápido incremento de actividad hasta los 42 d (Blas, 1986), 30 d según Lebas *et al.*

(1971), para seguir incrementándose más levemente hasta los 56 d momento en el cual se ha alcanzado la actividad del animal adulto. (Lebas *et al.*, 1971; Corring *et al.*, 1972; Alus y Edwards, 1976; Blas, 1986). Esta evolución parece depender del propio desarrollo pancreático. Blas (1986) observa que la actividad amilásica del conejo de 28 d, a pesar de ser baja con respecto a la del adulto, parece suficiente para digerir el almidón cuando el nivel de éste en la dieta es bajo (15%). Esto lo deduce tras comprobar que no hay diferencias en la cantidad de almidón presente en el íleon de animales de 28, 42 ó 56 d, alimentados con una dieta con un 15% de almidón, siendo esta cantidad muy baja (0,24% en media).

Con respecto a la dieta, dependiendo de la fente alimenticia que aporta el almidón, la concentración de almidón en íleon terminal varía. Es marcadamente mayor cuando la fuente es maíz que cuando es guisante o cebada (Gidenne y Pérez, 1993). Además, el origen del almidón afecta también significativamente su digestibilidad total: el almidón de cebada se digiere en su casi totalidad, mientras que el de maíz lo hace en un 88-95% (Blas *et al.*, 1990).

En cuanto al tipo de fibra, ésta no tiene influencia sobre la digestibilidad ileal del almidón, pero sí sobre la cantidad de almidón en el íleon de conejos adultos, según se desprende del trabajo de Merino y Carabaño (1992). Estos autores, sustituyendo alfalfa por orujo de uva o por pulpa de remolacha, comprueban que esta cantidad es significativamente mayor en la dieta de alfalfa que en la de pulpa (1,09 vs. 0,4%, respectivamente), aunque muy baja en ambos casos. Motta (1990), por el contrario, encuentra que esta cantidad es mayor en la dieta de pulpa que en las de alfalfa y orujo.

Otro factor que puede afectar la digestibilidad del almidón es el nivel de almidón de la dieta. Así, Blas (1986) observa que cuando el nivel de almidón aumenta de un 15 a un 31%, en dietas isofibrosas, la cantidad de almidón en la digesta del íleon terminal pasa de un 0 a un 4%, en animales jóvenes (28 d). En adultos (56 d), sin embargo, la cantidad encontrada es similar para los dos niveles de almidón (0,4%). Tales resultados pueden interpretarse como la consecuencia de que la escasez de amilasa

pancreática propia de los animales jóvenes, no llega a ser completamente compensada cuando la ingestión de almidón es elevada; en efecto, ni el aumento de la actividad total de la amilasa pancreática como respuesta del páncreas ante un aumento de sustrato, ni la actividad amilásica de otras fuentes llegan a compensar el aumento del nivel de almidón. En los animales adultos, sin embargo, ésto sí sucede. De todas formas, una concentración de almidón en el íleon del 4% sigue siendo baja e indica una alta digestibilidad del almidón. En consecuencia, no se puede concluir que los animales jóvenes digieran mal el almidón. A la misma conclusión llegan Corring *et al.* (1972); estos autores, que estudian principalmente la evolución de la actividad enzimática del páncreas en función de la edad (o del peso del conejo), deducen que la dieta sólida que se empieza a administrar a los animales después del destete (32 d), puede hacer aumentar la actividad total de la amilasa pancreática.

Blas *et al.* (1990), en un estudio sobre la **digestibilidad total** del almidón durante el crecimiento del conejo, observaron un aumento del coeficiente de digestibilidad aparente con la edad desde el post-destete (5 semanas) hasta el periodo de acabado (11 semanas) para 4 piensos experimentales estudiados, 2 de bajo contenido en almidón y 2 de alto contenido, a base de maíz. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Blas (1986) que indican un aumento de la actividad amilásica al comienzo del crecimiento.

II.1.2.2. Digestión enzimática de la proteína.

La digestión de la proteína comienza en el **estómago** por la acción del ácido clorhídrico (hidrólisis ácida) y de la pepsina gástrica que preparan el sustrato alimenticio, degradándolo a péptidos de 10 aminoácidos o menos, para la posterior actuación de las enzimas proteolíticas en el intestino delgado.

Según Marounek *et al.* (1995), el 50% de la actividad proteolítica digestiva se encuentra en el estómago, tanto de animales adultos como de jóvenes. A nivel gástrico, además del pienso, se digieren también las cecotrofas (que el conejo ingiere directamente del ano y traga sin masticar) lo que supone el aprovechamiento de sus

proteínas. Las cecotrofas no se mezclan directamente con el resto del contenido estomacal sino que permanecen intactas varias hs en el fundus del estómago (Griffiths y Davies, 1963; De Blas *et al.*, 1986) ya que están rodeadas por una cubierta mucosa que las protege del ataque del HCl. Mientras la capa mucosa permanece intacta, los microorganismos cecales continúan sus procesos fermentativos pues el pH se mantiene adecuado (en 4-5) gracias a un tampón fosfato presente en las cecotrofas, independientemente de que el pH estomacal sea de 1-2 (Griffiths y Davies, 1963). Las bacterias continúan fermentando hidratos de carbono y sintetizando proteína hasta que la cubierta mucosa finalmente se destruye y el contenido de las cecotrofas se somete a los procesos digestivos normales (Lang, 1981). De esta manera se aprovecha por un lado el N de la cubierta mucosa, y por otro, la proteína microbiana sintetizada por los microorganismos cecales. Además, en el *antrum* del estómago se segrega una sustancia bacteriolítica, activada por la pepsina, que ataca a las bacterias cecales liberadas permitiendo que la pepsina gástrica degrade su proteína (Viallard y Raynaud, 1968).

Pero es a nivel de **intestino delgado** donde se concluye la digestión proteica gracias a las proteasas pancreáticas (tripsina y quimiotripsina), que se vierten al duodeno, y a las carboxipeptidasas de las microvellosidades intestinales, dando lugar a tripéptidos, dipéptidos y aminoácidos libres.

La actividad proteásica en el intestino delgado del conejo evoluciona con la edad. Ya se observa tripsinógeno y quimiotripsinógeno en el páncreas en el momento del nacimiento apreciándose un aumento ligero pero regular de la actividad total de la quimiotripsina hasta la tercera semana coincidiendo con el crecimiento moderado del páncreas. Posteriormente y hasta los 43 d, dicha actividad total experimenta un aumento grande, paralelamente al crecimiento acelerado del páncreas y al aumento de su capacidad funcional. La actividad total de la tripsina presenta, sin embargo, un aumento más tardío, permaneciendo constante desde el nacimiento hasta el destete (30 d), para luego aumentar también hasta los 43 d. Las actividades específicas evolucionan de forma diferente; la de la quimiotripsina decrece desde el nacimiento

hasta, más o menos, la segunda semana, para luego mantenerse constante hasta los 43 d, y la de la tripsina, decrece hasta el destete y luego aumenta hasta los niveles que tenía la tercera semana, para mantenerse constante hasta los 53 d (Lebas *et al.*,1971; Corring *et al.*,1972). Los resultados de otros autores (Alus y Edwards,1976) apoyan los obtenidos en estos dos trabajos, al indicar que los niveles de tripsina y quimiotripsina pancreáticas aumentan linealmente desde el nacimiento hasta el destete, debido más a un aumento de la masa pancreática que a una mayor concentración de enzimas en dicho órgano.

Dentro de la bibliografía consultada no se han encontrado estudios por encima de esta edad (53 d), por lo que no se sabe si se ha alcanzado ya el estado de adulto o no.

La capacidad proteolítica del conejo depende, pues, del desarrollo del sistema endocrino, que lógicamente tiene que ver con la edad.

No obstante, ciertos autores prueban que la digestibilidad total de la proteína es mayor (del orden de 4-6 puntos porcentuales) a las 5-6 semanas (un poco después del destete) que a las 11 semanas (Maertens y De Groote,1982; Blas *et al.*,1990; Fernández *et al.*,1994). Según esto, se podría pensar que el animal joven, cuyo páncreas no ha alcanzado aún su desarrollo funcional, digiere mejor la proteína que el adulto. Sin embargo, este hecho hay que atribuirlo al acúmulo de pienso que se produce en el ciego durante el post-destete motivado por el comienzo de consumo del mismo, lo que conlleva una menor excreción y por consiguiente una alteración del balance digestivo, presentándose valores más elevados de digestibilidad de la proteína a esta edad.

En cuanto a la influencia de la dieta sobre la actividad de las proteasas pancreáticas, según Lebas *et al.* (1971) la actividad de la quimiotripsina se ve ligeramente estimulada por la alimentación (varía en función del contenido proteico de la dieta) mientras que la de la tripsina permanece indiferente desde el nacimiento hasta el destete.

Los datos de **digestibilidad ileal de la proteína** obtenidos en animales adultos son todavía escasos y muy variables. Varían entre un 28,4% (Merino y Carabaño,1992) y un 74% (Merino,1994) y dejan a los datos de otros autores comprendidos entre estos márgenes (Yu *et al.*,1987; Gidenne y Ruckebusch,1989; Gidenne *et al.*,1990; Gidenne,1992). De estos trabajos, que también presentan los datos correspondientes de **digestibilidad total de la proteína**, que varían de un 46 (Merino y Carabaño,1992) a un 73% (Gidenne *et al.*,1990), se deduce que del 47 al 100% de la proteína que se digiere lo hace antes del ciego. En animales jóvenes, de 5-6 semanas, aún no hay datos de digestibilidad ileal de la proteína.

Entre las posibles causas de esta variación, se podrían citar, en primer lugar, el nivel de fibra de la dieta. Así, Yu *et al.* (1987) encuentran que cuando la FB de la dieta pasa de un 5,5 a un 14,5%, la digestibilidad ileal de la proteína disminuye de un 39 a un 33%. Esto podría deberse a un posible efecto inhibitorio de la FB sobre la actividad de las proteasas del intestino delgado, tal y como apuntan Fedii *et al.* (1982). Sin embargo los resultados de Yu *et al.* (1987) es posible que se deban más a la fuerza de proteína de la dieta que al nivel de fibra, ya que para aumentar el nivel de FB sustituyen concentrados (cereales) por forraje (alfalfa), cuya proteína es menos digestible. Otro posible factor de variación podría ser el tipo de fibra. Así, cuando la alfalfa se sustituye parcialmente por orujo de uva, la digestibilidad ileal de la proteína disminuye de un 61 a un 28%. Esto puede deberse a que dicha sustitución trae consigo un cambio de proteína más digestible por otra más ligada a fibra y menos soluble y, por consiguiente, también menos digestible. Sería, por tanto, otra vez, un efecto del tipo de proteína. Otra causa de esta disminución podría ser un posible efecto inhibitorio de los taninos del orujo sobre la actividad proteásica (Merino y Carabaño,1992).

Por otra parte, hay una cuestión que nunca se tiene en cuenta a la hora de medir digestibilidad del N, ya que se mide digestibilidad aparente, y es la presencia de

N endógeno, bien a nivel ileal o fecal. Debido a la gran influencia que tiene este N sobre la digestibilidad de la proteína, dedicaremos a este asunto un apartado especial.

II.1.2.2.1. Pérdidas endógenas de Nitrógeno durante la digestión en monogástricos.

Durante la digestión se producen pérdidas de material endógeno, por lo que la digesta a estos niveles comprende, además del N no digerido procedente del alimento, productos de secreción endógena como enzimas digestivas, epitelio descamado y glicoproteínas de la mucosa digestiva, que constituyen la llamada proteína endógena (Pustzai *et al.*, 1991) y microorganismos (Ratcliffe, 1991). Además, puede haber N que se solubilice pero que no se absorba (por determinadas características físicas de la digesta, tales como viscosidad u osmolaridad) contabilizándose también como N no digerido (Cone y Van der Poel, 1993). Puesto que al hacer el cálculo de la digestibilidad de la proteína, todo el N presente en el contenido ileal o en las heces se considera N no digerido de la dieta, se obtienen valores de digestibilidad aparente de la proteína, siendo estos valores más bajos que los valores de digestibilidad real.

La cantidad que supone este N no alimenticio no se ha medido en conejos, por lo que no se sabe la influencia que puede tener sobre los coeficientes de digestibilidad total o ileal de la proteína.

En otros monogástricos, sin embargo, sí se ha cuantificado el N y los aminoácidos endógenos y microbianos en el íleon terminal y en las heces. En el cerdo, el contenido de N endógeno **en el íleon** varía entre el 50 y el 70% del total, según distintos autores y según diversas causas:

- la técnica empleada para su determinación (Souffrant, 1991). Uno de los métodos para medir el N no alimenticio del íleon o fecal consiste en el análisis del contenido del íleon o de las heces después de administrar una dieta sin proteínas durante un periodo de tiempo variable. Utilizando este método, Wünsche *et al.* (1987) obtienen un valor de proteína endógena diaria en el íleon de 13,87 g PB/Kg MS ingerida y en heces de 8,51 g. Sin embargo, se ha comprobado que las secreciones

endógenas pueden inhibirse al administrar ese tipo de dietas (Low, 1982), por lo que últimamente se han desarrollado otros métodos para medir estas secreciones.

Así, otra forma es utilizar dietas con proteína y marcar ésta con homoarginina o con isótopos radiactivos (^{15}N). Si se usa la técnica de dilución con ^{15}N , también se puede marcar todo el N del animal (en vez del N del alimento) administrando el marcador por vía oral o intravenosa. De esta última manera determinaron De Lange *et al.* (1989 a y b) la proteína endógena en el íleon terminal; administrando dietas libres de proteína a cerdos canulados a este nivel obtuvieron una media diaria de 20 g PB/Kg de MS ingerida. En trabajos posteriores (De Lange *et al.*, 1990), marcando esta vez la proteína de la dieta con ^{15}N , obtuvieron valores de proteína endógena mucho mayores (de 25,5 a 30,5 g PB/Kg MS ingerida). Los valores obtenidos por Furuya y Kaji (1992) fueron de 13,75 a 28,75 g PB/Kg MS ingerida.

Por otra parte, estudios en ratas alimentadas con cebada marcada con ^{15}N indican que la mayor parte del N que pasa por el íleon es de origen endógeno (Partridge *et al.*, 1985).

Otro método para medir el N endógeno cuando se administran dietas con proteína, es el método de regresión. En este caso se asume que la cantidad de N endógeno es constante cuando se administran dietas con proteína, independientemente del nivel de proteína de la dieta. Se mide la cantidad de N (o de aminoácidos) en el íleon o en las heces con contenidos decrecientes de proteína en la dieta, y se extrapola a 0 (regresión lineal) para hallar la secreción endógena. Utilizando este método, Taverner *et al.* (1981) encuentran que la cantidad endógena en el íleon es de 14,38 g PB/Kg MS ingerida, diarios.

- el nivel y el tipo de fibra de la dieta: Un aumento del nivel de FND de la dieta da lugar a una menor digestibilidad aparente ileal de la proteína debido a un incremento del N endógeno y a una menor absorción del N exógeno (Schulze *et al.*, 1994). En efecto, los aminoácidos y péptidos se adhieren a la fibra y no se absorben. Lo mismo les sucede a las enzimas proteolíticas, por lo que su actividad

disminuye. Por último, al aumentar la fibra, se produce una mayor descamación de la mucosa intestinal y una mayor producción de mucus, es decir una mayor cantidad de N endógeno (Sauer *et al.*, 1991).

En cuanto al tipo de fibra, la incorporación de pectinas en la dieta aumenta el N endógeno en el íleon terminal (De Lange *et al.*, 1989).

- el nivel de ingestión La secreción endógena de N y aminoácidos al íleon está muy afectada por el nivel de ingestión, encontrándose una correlación lineal positiva para el N y la mayoría de los aminoácidos, aunque para Lys, Glu y Phe la relación es curvilínea (Butts *et al.*, 1993).

Según Livingston *et al.* (1980), el N endógeno es digerido más lentamente que la proteína originaria del alimento y tiende a ser sólo parcialmente absorbido según el tipo de dieta, pudiendo constituir así una gran proporción del N que fluctúa por el íleon terminal. Sin embargo, según Souffrant *et al.* (1993), el 79% del N endógeno es reabsorbido al final del intestino delgado y el 88% en todo el tracto digestivo.

En cuanto al contenido de N **en las heces**, según Sauer *et al.* (1991), en cerdos, el N microbiano supone de un 72,2 a un 86,2% del N total de las heces y depende de la dieta. Estos valores están de acuerdo con los obtenidos en otros estudios: 50-90%, dependiendo de la disponibilidad de energía en el intestino grueso para el metabolismo microbiano.

En conejos, en la escasa bibliografía existente se encuentran valores de porcentaje de N bacteriano respecto al N total de las heces blandas de 81% (Griffiths y Davies, 1963) o de 74% (Spreadbury, 1978). Resultados recientes obtenidos en nuestro Departamento (García *et al.*, 1994) indican que el N bacteriano en heces duras de conejo varía en torno al 30%. Este valor, inferior en relación a los encontrados en cerdos, se debe al reciclado del N bacteriano cecal a través de la coprofagia que permite que pueda ser absorbido a nivel ileal.

II.1.2.3. Digestión enzimática de la grasa.

La digestión de las grasas, en el conejo adulto, se realiza directamente en el **intestino delgado** por la acción de la lipasa pancreática tras su emulsión por los ácidos biliares. No se ha encontrado actividad lipolítica en el estómago de los animales adultos, según apuntan Marounek *et al.* (1995), aunque sí en animales jóvenes, permitiéndoles utilizar la grasa de la leche materna.

La actividad lipásica del conejo evoluciona con la edad, observándose un aumento ligero y regular desde el nacimiento hasta los 24 d, coincidiendo con el crecimiento ligero del páncreas, y un gran aumento (tanto de la actividad total como de la específica) desde los 24 hasta los 30 d coincidiendo con el crecimiento acelerado y con el desarrollo funcional del páncreas. Corring *et al.* (1972) continúan la investigación hasta los 43 d y observan que la actividad lipásica, total y específica, que experimenta un gran aumento a partir de los días 21-24, va aumentando linealmente hasta los 43 d. Dentro de la bibliografía consultada no se han encontrado estudios por encima de esta edad, por lo que no se sabe si se ha alcanzado ya el estado de adulto o no.

En cuanto a la influencia de la alimentación sobre la actividad lipásica del conejo, según Lebas *et al.* (1971) ésta es indiferente al contenido lipídico de la dieta desde el nacimiento hasta el destete (30 d).

Fernández *et al.* (1994), estudiando los coeficientes de **digestibilidad total** del extracto etéreo (EE) de dietas con contenidos y tipos de grasa distintos en conejos de 5 semanas (recién destetados) y en conejos en crecimiento (2 Kg), obtuvieron siempre valores mayores (7 puntos) en los animales jóvenes. Esto, sin embargo, no significa que la digestibilidad de la grasa sea mayor en los animales recién destetados, pues hay que tener en cuenta que el balance digestivo está alterado en los animales de esta edad: al comenzar a consumir pienso tras la lactancia, se produce una retención a nivel cecal, lo que se traduce en una menor excreción, dando valores altos de digestibilidad tanto de la proteína (como ya se comentó en el apartado II.1.2.2.) como de la grasa.

No hay datos de **digestibilidad** ileal, pero las bajas concentraciones de grasa encontradas en el ciego y en las heces de animales adultos (3% según Fernández *et al.*, 1991) sugieren una alta digestibilidad de la grasa a nivel **ileal y total**.

El coeficiente de digestibilidad total, en conejos adultos, depende del tipo de grasa; así las grasas de los alimentos tienden a digerirse peor que las grasas libres (50-80% vs. 85-95%) y las grasas saturadas peor que las insaturadas (Maertens *et al.*, 1990; Fernández *et al.*, 1991), como ocurre también en otras especies.

II.1.2.4. Digestión pre-cecal de la fibra.

Aunque ha sido tradicionalmente asumido que la digestión de la fibra es post-ileal, llevada a cabo por los microorganismos fermentadores del ciego, aumenta la evidencia de que la desaparición de la fibra antes del intestino grueso es pequeña pero positiva.

En efecto, en estudios con cerdos, Sambrook (1979) indica que la digestibilidad pre-cecal de la FAD puede variar de un 8 a un 50% dependiendo de la dieta, siendo del 40% la digestibilidad de la hemicelulosa para Drochner (1984). Zoipoulus *et al.* (1983) indican que la digestibilidad de la FB en el íleon terminal es del 25 al 40% y Millard y Chesson (1984) encuentran coeficientes de digestibilidad de la celulosa a este nivel variando del 10 al 24%.

En conejos, los escasos datos que presenta la bibliografía sobre coeficientes de **digestibilidad ileal de la fibra** muestran valores de 7 a 19% (Yu *et al.*, 1987) y de 0 a 30% (Merino y Carabaño, 1992) para la FB y de 0 a 17% (Gidenne, 1992) para los polisacáridos no amiláceos totales (NSP), siendo la arabinosa y los ácidos urónicos (que componen las pectinas) los más fácilmente fermentescibles, con digestibilidades de 14 a 41% y de 20 a 38%, respectivamente, mientras que las galactosa, glucosa y xylosa no sufren digestión alguna a este nivel.

Esta desaparición pre-cecal de la fibra no se debe a la acción de enzimas endógenas del animal, sino más bien a las enzimas de cierta microflora existente en el intestino delgado que hasta ahora había sido infravalorada en los monogástricos. En este

sentido, los primeros trabajos, en conejos, se deben a Smith (1965), citado por Penney *et al.* (1986). Este autor habla de *Bacteroides* como únicos microorganismos presentes en el estómago e intestino delgado. Más tarde, Bonnafous y Raynaud (1970) detectan en el intestino delgado de 10^6 a 10^8 bacterias/g de digesta, y Penney *et al.* (1986) detectan también *Bacteroides* (10^9 bacterias viables/ml) e igual cantidad de *Bacillus*, 10^3 , tanto en el estómago como en el duodeno. La presencia de este tipo de microorganismos en segmentos no fermentativos del tracto digestivo, se explica por la reingestión del contenido cecal mediante la coprofagia, tal y como apuntaba Smith (1965), citado por Penney *et al.* (1986), tras comprobar que si se impedía la coprofagia no se encontraban microorganismos ni en estómago ni en intestino delgado. Trabajos más recientes (Marouek *et al.*, 1995) también sustentan esta teoría, tras encontrar en estómago e intestino delgado enzimas propias del contenido cecal. Según estos autores hay actividad pectinásica y xilanásica alta en todos los segmentos del tracto digestivo así como actividad celulásica baja. Esto hace posible una cierta digestión pre-cecal de la fibra. Hay evidencia de que los microorganismos se adhieren íntimamente a las células de la pared vegetal "viajando" así con el flujo de la digesta. De esta forma ejercen una degradación primaria antes del ciego preparando el sustrato para la posterior fermentación por las enzimas fibrolíticas (celulasas, hemicelulasas, etc) de los microorganismos cecales (Hungate, 1984). Por otra parte, es posible que los valores altos de digestibilidad ileal de la fibra se deban a que se contabiliza toda la fibra desaparecida como fibra digerida, sobrevalorándose, por tanto, la digestión de la fibra a este nivel.

II.1.3. Digestión en el ciego. Fermentación microbiana.

Los residuos del alimento no digeridos en el intestino delgado junto con el material endógeno secretado llegan al ciego y al colon proximal. Aquí tiene lugar un complejo mecanismo de separación de partículas de tal forma que sólo son retenidas en el ciego las de menor tamaño y las sustancias solubles, mientras que las de mayor tamaño continúan su tránsito a través del tracto digestivo (Björnhag, 1972; Pickard y

Stevens, 1972). El material que entra en el ciego es el susceptible de ser fermentado por la flora microbiana y el que da lugar a las heces blandas mientras que el material indigestible origina las heces duras, como se describe en el apartado II.1.5. de esta revisión. El ciego es un lugar de activo metabolismo bacteriano donde se produce energía y nutrientes extras que el conejo aprovecha bien por absorción directa (AGV y NH_3) o a través de la coprofagia (proteína bacteriana).

La capacidad fermentativa cecal se mide valorando los productos finales de la fermentación: los ácidos grasos volátiles (AGV) y el amoníaco (NH_3), y midiendo el pH.

II.1.3.1. Actividad enzimática y microbiana del ciego.

La fermentación cecal no ha sido estudiada muy extensamente, pero se sabe que depende de la capacidad enzimática a este nivel así como de la disponibilidad de sustrato y del tiempo de permanencia del mismo en el ciego.

En cuanto a la **capacidad enzimática**, Makkar y Singh (1987) comparan la actividad enzimática del ciego con la del rumen, detectando en el ciego actividades amilásica, proteásica y ureásica mayores, actividad transaminásica igual y actividad celulolítica menor que en el rumen. También detectan actividad de enzimas asimiladoras de NH_3 en cantidades variables con respecto al rumen. Posteriormente, Marounek *et al.* (1995) observan la presencia de numerosas enzimas en el ciego del conejo adulto. Así, encuentran actividades amilásica, proteásica, pectinásica, xilanásica, maltásica y ureásica altas, y actividad celulásica baja. Coppola *et al.* (1973) también encuentran actividad ureásica en el contenido cecal y Blas (1986) encuentra actividad amilásica, comprobando, además, que la amilasa microbiana cecal tiene una actividad menor que la amilasa pancreática. De todos estos resultados se deduce que el ciego del conejo está bien equipado para digerir almidón, para degradar proteína y para hidrolizar urea (fuente de N no proteico) a NH_3 .

Las amilasas microbianas tienen poca importancia en el ciego teniendo en cuenta que el material que llega a él es pobre en almidón; sin embargo, podrían cobrar particular relevancia, ya que mediante la coprofagia este potencial amilolítico, junto

con amilasas procedentes del intestino delgado, es transferido al estómago, donde el sustrato sí es considerablemente rico en almidón (Blas, 1986).

La flora cecal presenta también capacidad para degradar pectinas y hemicelulosas. Sin embargo, su capacidad para degradar la celulosa es baja, lo que se traduce en una baja digestibilidad de la FB. Además es capaz de sintetizar aminoácidos para formar proteína microbiana.

La bibliografía presenta escasos datos sobre el número y el tipo de **microorganismos** presentes en el tracto gastro-intestinal del conejo adulto. Los primeros trabajos se deben a Smith (1965), citado por Penney *et al.* (1986), que habla de *Streptococos* en ciego y heces. Trabajos más recientes dicen que, en el ciego y colon del animal adulto, la cantidad de microorganismos, expresada en términos de número más probable (NMP), puede llegar a ser de 10^9 a 10^{11} bacterias/g de MS cecal (Bonnafeous y Raynaud, 1970 y Emaldi *et al.*, 1979, respectivamente). Esta alta cantidad varía, además, muy poco entre individuos. Dominan los *Bacillus spp.*, Gram - y no esporulados (Gouet y Fonty, 1979; Vernay y Marty, 1984; Morisse *et al.*, 1985). Hay también cantidades importantes de anaerobios estrictos esporulados, *Clostridium spp.*, aunque en número muy inferior al de los *Bacillus*, así como de *Streptococcus spp.*, destacando la ausencia de *Lactobacillus spp.* en todo el tracto digestivo del conejo (Fonty *et al.*, 1979; Penney *et al.*, 1986).

Emaldi *et al.* (1979) dividieron las bacterias cecales en grupos, según su preferencia por el sustrato, estableciendo como flora dominante la que utiliza NH_3 , en $3,4 \pm 1,0 \times 10^8$ bacterias/g MS cecal, seguida por la ureolítica, en $7,7 \pm 1,6 \times 10^7$, la proteolítica, en $7,1 \pm 1,6 \times 10^7$ y en último lugar la celulolítica, en $3,7 \pm 1,2 \times 10^6$. La flora xylanolítica y pectinolítica alcanza un nivel de 5×10^9 bacterias/g MS cecal (Fonty y Gouet, 1989). Ya Davies (1965), citado por Emaldi *et al.* (1979) y por Fonty y Gouet (1989), demostró la presencia de bacterias celulolíticas en el contenido intestinal del conejo. En los conejos jóvenes existen bacterias celulolíticas en ciego y colon a los 16 d: 6×10^3 bacterias/g MS cecal (Boulaheouf *et al.*, 1986), citado por Fonty y Gouet

(1989). De la misma manera, Morisse *et al.* (1985) y Marounek *et al.* (1995) demuestran que existe ya una implantación de microflora celulolítica antes del destete.

La población de protozoos del aparato digestivo del conejo no está bien descrita y su significado nutricional en la fermentación cecal es todavía desconocido. Lelkes y Chang (1987), citado por Cheeke (1987), sitúan la población de protozoos en el ciego del conejo en 10^6 /ml de contenido.

En cuanto a los factores que afectan a la capacidad enzimática cecal, Blas (1986) indica que la actividad amilásica del contenido cecal no depende de la edad pero sí del tipo de dieta, encontrando mayor actividad cuando aumenta el nivel de almidón en dietas isofibrosas. Sin embargo, trabajos de digestibilidad *in vitro* con contenido cecal de conejos de distintas edades, sugieren que los microorganismos cecales de los conejos jóvenes, recién destetados (4 semanas), tienen una actividad limitada para digerir almidón (Aderibigbe y Cheeke, 1992). Esto apoya la hipótesis de Cheeke y Patton (1980) acerca de la sobrecarga de hidratos de carbono en el ciego dando lugar a disbiosis cecal y diarrea. Por otra parte, Fedii *et al.* (1982) observan una actividad amilásica mayor al incrementar la fibra de la dieta, mientras que otros autores la que encuentran incrementada es la actividad celulolítica (Boulahrouf *et al.*, 1987), citado por Fonty y Gouet (1989).

Los microorganismos del ciego participan muy activamente en el metabolismo nitrogenado del conejo ya que utilizan NH_3 como principal fuente de N. Dicho NH_3 procede, en su mayor parte (75%), de la hidrólisis de la urea del contenido ileal (residuos nitrogenados de la dieta y material endógeno) y en menor cantidad (25%) del torrente sanguíneo. El NH_3 es asimilado por las bacterias para la síntesis de proteína microbiana (que a su vez será aprovechada por el conejo a través de la coprofagia) ó absorbido directamente por la pared del intestino grueso para la síntesis de urea en el hígado (Hoover y Heitman, 1972).

La capacidad de utilizar N no proteico, NNP (urea, NH_3) por la flora cecal para la síntesis de proteína microbiana ha sido demostrada por varios autores (Haupt, 1963,

citado por Emaldi *et al.*,1979; Knutson *et al.*,1977; Semertzakis,1978; Emaldi *et al.*,1979; Makkar y Singh,1987; Marounek *et al.*,1995).

La asimilación del NH_3 por los microorganismos depende de la disponibilidad simultánea de sustratos hidrocarbonados en el ciego, de tal forma que si hay déficit energético se producirá un acúmulo de NH_3 a nivel cecal. Los microorganismos obtienen la energía necesaria de las paredes celulares de los vegetales ingeridos (gracias a su capacidad para digerir fibra dando lugar a AGV), de los compuestos no fibrosos de los vegetales y de los mucopolisacáridos endógenos del aparato digestivo.

Son escasos los datos que presenta la bibliografía sobre el coeficiente de **digestibilidad cecal de la proteína**, pero de todos ellos se puede concluir que es mucho menor que el coeficiente de digestibilidad ileal, variando entre el 0 y el 24% (Gidenne y Ruckebusch,1989; Gidenne *et al.*,1990; Merino y Carabaño,1992; Gidenne,1992; Merino,1994) y suponiendo entre el 0 y el 38% de la proteína total que se digiere.

El NH_3 y los AGV son los principales responsables de la acidez del ciego, contribuyendo a mantener un pH que permite el equilibrio de la microflora. El pH tiende a hacerse menos ácido cuando disminuyen los AGV o cuando aumenta el NH_3 , y más ácido cuando aumentan los AGV. El pH del ciego presenta valores comprendidos entre 5,4 y 6,3, en la mayoría de los trabajos, con un pH medio de 5,9 (Pote *et al.*,1980; Gidenne y Lebas,1984; Fraga *et al.*,1984; Carabaño *et al.*, 1989; Fraga *et al.*,1991; García *et al.*, 1994; Bellier *et al.*,1995). Algunos autores encuentran valores cercanos a la neutralidad (6,7) o ligeramente superiores (7,2) (Ruckebusch y Fioramonti,1976; Champe y Maurice,1983). No obstante, hay que destacar que las variaciones en el pH dentro de cada trabajo son menores (inferiores a 0,5 puntos) que entre trabajos.

Además de estos dos importantes productos de la fermentación microbiana en el ciego (AGV, NH_3), se ha demostrado que también se sintetizan vitaminas del grupo

B y K en el ciego del conejo adulto, y se ha comprobado que las heces blandas contienen cantidades mucho mayores de estas vitaminas que el alimento.

Junto a la capacidad enzimática y microbiana, la **disponibilidad de sustrato** y el **tiempo de permanencia** del mismo en el ciego afectan a la capacidad fermentativa cecal y se ven influidas por la dieta y el tamaño y solubilidad de las partículas que entran en el ciego (Lebas y Laplace, 1977 a,b,c; Auvergne *et al.*, 1987; Bouyssou *et al.*, 1988).

En esta revisión no se tratan los aspectos relacionados con la composición cecal o disponibilidad de sustrato para la fermentación microbiana, pero sí lo referente al tiempo de permanencia del alimento en el ciego, así como en los demás compartimentos digestivos, cuestión que se discute en el apartado II.1.4.

II.1.4. Velocidad de tránsito digestivo.

II.1.4.1. Factores de variación.

El tránsito digestivo es muy rápido en el conejo y se puede estimar a través del tiempo medio de retención (**TMR**), tiempo que la digesta permanece retenida en el tracto digestivo. El TMR, que se calcula midiendo la excreción fecal de un marcador administrado en la dieta, incluye el tiempo de tránsito (**TT**) y el tiempo de retención en los compartimentos de mezcla (**TM**). El TT es el tiempo transcurrido entre el momento de la dosificación y la aparición del marcador en las heces, y representa el tiempo de permanencia en el segmento tubular del tracto, fundamentalmente en el intestino delgado y en el colon distal. El TM es el tiempo de retención en el estómago, ciego y colon proximal y supone dos tercios del tiempo de retención total. El TM se puede estimar sustrayendo el TT del TMR (Gidenne *et al.*, 1991).

En general, en la bibliografía se encuentran valores de TMR de 9 a 30 h, (Laplace y Lebas, 1975; Udén *et al.*, 1982; Fraga *et al.*, 1984; Sakaguchi *et al.*, 1987; Gidenne *et al.*, 1987 y 1991; Gidenne y Ruckebusch, 1989; Fraga *et al.*, 1991; Luick *et*

al., 1992; Gidenne, 1992, 1993 y 1994). Esta variación se debe a factores muy diversos, entre los que cabe citar el método de medida (tipo de marcador, hora de administración del marcador, cálculo matemático del TMR); el tipo de alimento (tamaño de partícula, nivel y tipo de fibra); la ingestión de alimento (*ad libitum*, restringida) o el animal (edad, coprofagia permitida o no).

El tipo de alimento es, pues, uno de los factores que influyen en la velocidad de tránsito digestivo. Del tamaño de las partículas depende la rapidez de su excreción. Gidenne (1992) observa un aumento del TMR de 1,8 h al disminuir el tamaño de las partículas de fibra (alfalfa) de 3 a 1 mm, para un mismo nivel de fibra (35,7% de FND). Posteriormente, Gidenne (1993) encuentra un TMR para las partículas finas (<0,3 mm) de 8,7 h más que para las de tamaño comprendido entre 0,3 y 1 mm, y observa que este aumento del TMR se debe a una mayor permanencia de las partículas finas en el ciego, ya que el TT no varía, siendo de unas 7 h en media. A una conclusión similar habían llegado ya otros autores (Laplace y Lebas, 1975 y 1977), para los cuales las partículas alimenticias más finas, por la segregación que sufren en el colon proximal, retornan al ciego donde quedan retenidas más tiempo, 3-4 h más que las partículas gruesas. Además, según apuntan Bouyssou *et al.* (1988), una molienda fina favorece el antiperistaltismo del colon proximal aumentando el TMR de las partículas finas. Un mayor tiempo de retención de las partículas finas (<0,075 mm) comparado con las de mayor tamaño (>0,3 mm) ha sido también comprobado por Udén y Van Soest (1982) y por Sakaguchi y Hume (1990). Sin embargo, Sakaguchi *et al.* (1992) obtienen unos resultados opuestos: un TMR significativamente mayor (al 5%) para las partículas grandes (0,2-2 mm) que para las partículas pequeñas (<0,15 mm).

En cuanto al tratamiento del alimento, el que esté granulado o en forma de harina parece que no altera el TMR (Lebas y Laplace, 1977b).

El nivel y el tipo de fibra influyen también sobre el TMR. El mecanismo por el cual la fibra tiene un efecto sobre el tránsito digestivo no está claro aún. Así, el TMR puede verse afectado por la acción directa de las paredes celulares (naturaleza química, estructura física de la fibra) sobre las paredes del tracto digestivo, o por el

aumento o la disminución de la ingestión voluntaria asociado a un alto o a un bajo contenido en fibra de la dieta, respectivamente (Lebas y Laplace, 1977a).

En cuanto al nivel de fibra, en general se observa que, a medida que aumenta el contenido en fibra del pienso, se acelera el tránsito y disminuye la permanencia del alimento en el aparato digestivo. Para dietas con un 7% y un 19% de FB los tiempos de retención son de 18,35 y 11,72 h, como media, respectivamente (Fraga *et al.*, 1984). De la misma manera, Gidenne (1992) obtiene que un incremento del nivel de FND del 24 al 36% reduce el tiempo de retención total de 20 a 14 h, cuando los conejos se alimentan *ad libitum*. El mismo autor, dos años más tarde (Gidenne, 1994), obtiene resultados similares: también con animales alimentados *ad libitum*, observa que, para tres niveles crecientes de FND (21,7, 30,4 y 39,6%), los TMR total son 28,6, 21,7 y 16,6 h, respectivamente; es decir que al aumentar el contenido en fibra, el TMR disminuye en 12 h. En otro trabajo, Gidenne (1993), con alimentación restringida, obtiene que el TMR se reduce significativa pero ligeramente (de 30,2 a 28,8 h) al aumentar el nivel de FAD (de 16 a 22%). De estos últimos trabajos se puede concluir que el efecto que tiene el nivel de fibra sobre el TMR se debe a una variación en el consumo.

En cuanto al tipo de fibra, se acepta, en general, que la fracción poco digestible de las paredes celulares (ligno-celulosa) estimula la motilidad intestinal e incrementa la velocidad de tránsito digestivo; al contrario, la fracción altamente digestible (pectina, fibra soluble, etc) incrementa la viscosidad del contenido intestinal disminuyendo la velocidad de tránsito.

El efecto que produce la inclusión de fibras altamente digestibles, como las pulpas, en la dieta, varía según el trabajo consultado. Algunos autores observan una disminución de la motilidad intestinal y un aumento del tiempo de retención estomacal y cecal. Así, Fioramonti *et al.* (1979), al comparar la pulpa de remolacha con el heno de alfalfa como fuentes de fibra, observan que la pulpa triplica el tiempo de retención en el ciego, y Bouyssou *et al.* (1988) encuentran que la pulpa aumenta ($p < 0,05$) el tránsito ceco-anal en 2 h con respecto a la alfalfa (de $7,9 \pm 2,2$ h a $9,9 \pm 2,7$ h). Fraga

et al. (1991), sin embargo, no obtienen diferencias significativas al 5% entre los TMR de las pulpas de cítricos y de remolacha y el heno de alfalfa (17,9; 17,2 y 16,5 h, respectivamente). Si bien, esto se debe, según los autores, a la forma de cuantificar el marcador de fase sólida de la digesta utilizado (fucsina básica); en efecto, se utiliza una lupa para ver las partículas así marcadas, por lo que sólo es posible visualizar las partículas más groseras (fracción ligno-celulósica del alimento), que al no entrar en el ciego se excretan muy rápidamente; y no se ven las partículas más solubles (presentes en las pulpas) que quedan retenidas más tiempo. En consecuencia, se subestima el TMR de la digesta de las dietas con fibra altamente digestible como las pulpas. Estos mismos autores, al sustituir heno de alfalfa por orujo de uva, obtienen uno de los valores de TMR más bajos encontrados en la bibliografía: 9,3 h (lo que supone una disminución significativa del TMR de 7 h con respecto al heno de alfalfa). La sustitución de heno de alfalfa por cascarilla de arroz, al igual que las pulpas, tampoco da diferencias significativas en el TMR con respecto a la alfalfa. Esto, que no era lo esperado teniendo en cuenta el alto contenido en lignina de la cascarilla, los autores lo explican por el pequeño tamaño de sus partículas de fibra con respecto a las otras fuentes de fibra estudiadas en este trabajo. Gidenne *et al.* (1987), tampoco encuentran diferencias significativas en el TMR al sustituir heno de alfalfa por pulpa de remolacha o salvado de trigo (14,8; 16,6 y 18,4 h, respectivamente).

El nivel de ingestión también influye en el TMR, que es mayor cuando se restringe que cuando se administra *ad libitum*. Ledin (1984) obtiene un TMR de 12,6 h en consumo voluntario mientras que restringiendo al 50 ó 60%, los TMR son de 26,1 y 19,7 h respectivamente. En el trabajo de Gidenne *et al.* (1987), sin embargo, el racionamiento (2/3 *ad libitum*) no aumenta significativamente ($p>0,05$) el TMR de una dieta con un 90% de heno de alfalfa ni de una dieta de heno-pulpa, aunque sí de una dieta de heno-salvado (aumento de 4 h).

El TMR se ve también influido por la práctica de la coprofagia. En efecto, Udén y Van Soest (1982) muestran que en ausencia de coprofagia (conejos con collar), el TMR de las partículas finas es menor, mientras que el de las partículas gruesas

permanece invariable con respecto al periodo de control. Asimismo Fraga *et al.* (1984) encuentran que, en los conejos con collar, disminuye significativamente el tiempo de permanencia en el aparato digestivo (de un 3 a un 25%) de las dietas de bajo contenido en fibra, mientras que no varía el de los piensos de alto contenido en fibra. Fraga *et al.* (1991) observan que, si no se tiene en cuenta la coprofagia, el TMR bien permanece inalterado (dietas con pulpa de remolacha, orujo de uva o cascarilla de arroz) o bien disminuye unas 7 h (dietas con heno de alfalfa o pulpa de cítricos). Según Luick *et al.* (1992), si se impide la coprofagia el TMR de las partículas de alfalfa disminuye a la mitad (pasando de 19,5 a 10 h).

II.1.4.2. Tiempo de permanencia de los alimentos en los diferentes segmentos digestivos.

En un principio, el estudio del tiempo de permanencia del alimento en cada tramo digestivo se llevaba a cabo mediante la técnica de los sacrificios comparativos seguida de una medida de la concentración de marcador en diferentes segmentos. Así, Lebas (1979) estimó que el tiempo medio de permanencia de los alimentos en el estómago era de 4 a 6 h, que el tránsito a través del intestino delgado era muy rápido y en oleadas, con una cierta retención a nivel ileal (la digesta atravesaba muy rápido el duodeno, tardaba de 10 a 20 min en atravesar el yeyuno y de 30 a 60 min el íleon), y que el alimento permanecía de 6 a 9 h en el ciego. Los tiempos estimados por Gidenne y Poncet (1985) eran más cortos: 3-4 h en estómago y 4-6 h en ciego.

Posteriormente, el estudio del tiempo de permanencia de los alimentos en los diferentes compartimentos digestivos ha sido abordado, en el conejo, utilizando la técnica de la canulación ileal y la integración numérica, para calcular la cinética de excreción de los marcadores. Estos trabajos son escasos por la dificultad que conlleva la implantación de cánulas, pero permiten obtener los TMR total e ileo-rectal y estimar los TMR oro-ileal y estomacal por diferencia. Así, Gidenne (1992) obtiene valores de TMR ileo-rectal de 12 h en una dieta baja en fibra (24% FND) y de 6,5 h en una dieta alta en fibra (36% FND) siendo el TMR oro-ileal de unas 8 h, independientemente del

nivel de fibra. El nivel de fibra modifica, por tanto, el tiempo de permanencia en el ciego, pero no en el estómago e intestino delgado, el cual no se modifica significativamente. Para Gidenne y Ruckebusch (1989) el TMR ileo-rectal es de 9,6 h, mientras que el TMR oro-ileal es de 9 h. En los trabajos más recientes, (Gidenne,1994), el TMR en ciego y colon proximal se duplica (de 12,8 a 23,8 h) al disminuir el nivel de fibra (de 39,6 a 21,7% de FND) sin afectarse significativamente el tiempo medio de retención oro-ileal (una media de 4,6 h). Además, este autor estima el TMR en el estómago según la fórmula:

$$\text{TMR}_{\text{estomacal}} = [(\text{TMR}_{\text{total}} - \text{TMR}_{\text{ileo-rectal}}) - (\text{TT}_{\text{total}} - \text{TT}_{\text{ileo-rectal}})]$$

y obtiene valores de 2,6 y 0,9 h para los dos niveles de fibra utilizados, respectivamente.

La utilización de modelos matemáticos (Grofum-Williams y Ellis) que permiten estimar el tiempo de permanencia en diferentes compartimentos digestivos a partir, simplemente, del análisis de la cinética de excreción fecal de los marcadores, ha sido validada por Gidenne (1994), al obtener valores de TMR total, cecal y estomacal similares a los obtenidos según el método de integración numérica (método de referencia). Estas modelizaciones son ventajosas pues simplifican la obtención de los valores de TMR total así como en los principales compartimentos (estómago y ciego-colon proximal) y en la porción tubular del tracto digestivo.

II.1.5. Características y producción de heces duras y blandas. Coprofagia.

II.1.5.1. Formación y composición química de los dos tipos de heces.

La fisiología digestiva del conejo está caracterizada por la formación de dos tipos de heces, las heces duras y las heces blandas, y por la reingestión de estas últimas mediante el fenómeno de la coprofagia.

El conejo doméstico produce los dos tipos de heces según el siguiente esquema (Björnhag,1972 y 1981; Pickard y Stevens,1972; Hörnicke,1981; Jilge, 1982;

Gallouin,1983): El alimento no digerido pasa a través de la válvula ileal, parte directamente al ciego y parte al colon proximal. El colon está sujeto a fuertes movimientos antiperistálticos que empujan la digesta hacia el ciego. El ciego, por su parte, está siempre en continuo movimiento y su contenido es constantemente mezclado mediante rápidas contracciones desde la base hasta el apéndice y viceversa. En el colon se producen también unas contracciones fuertes y lentas desde el extremo anterior al posterior. Estos movimientos causan un flujo y reflujo constantes de material entre el colon proximal y el ciego provocando que las partículas de mayor tamaño junto con algo de fluido tiendan a desplazarse desde el ciego hacia el colon, y las de menor tamaño junto con mayor cantidad de fluido tiendan a ir hacia el ciego. Este movimiento retrógrado de partículas pequeñas se ve facilitado por la secreción de agua en el colon proximal y por su gran absorción hacia el ciego. El resultado de este proceso es la retención selectiva de fluido y pequeñas partículas en el ciego, permitiendo la excreción de las partículas más grandes y menos digestibles del alimento. Las heces duras se originan, por tanto, a partir de las partículas grandes y son empujadas hacia el colon proximal posterior donde el agua no es absorbida sino exprimida mecánicamente y retorna hacia el ciego (Pickard y Stevens,1972). Las heces blandas se producen tras un número variable de horas (según autores, ver apartado II.1.4.2.) de actuación de los microorganismos sobre el contenido cecal. Son racimos de 8 a 10 pequeñas esferas de material blando y color oscuro rodeadas por una envoltura mucosa. Su contenido, de origen cecal, incluye no sólo material digerido y sometido a la acción de los microorganismos del ciego, sino considerables cantidades de bacterias. La evacuación de las heces blandas va siempre precedida por la completa eliminación de las heces duras, ya que una vez excretadas las heces duras, los movimientos antiperistálticos del colon se relajan, facilitando la excreción de las coprófagas.

La formación de los dos tipos de heces sigue un ritmo nictemeral. En condiciones de 12 h de luz y 12 h de oscuridad al día y alimentación *ad libitum*, el periodo de excreción de heces duras guarda un gran paralelismo con el periodo de

ingestión de alimento, y tiene lugar durante las horas de oscuridad; la excreción de coprófagas se produce durante el periodo diurno (Jilge,1974; Lebas y Laplace,1975; Fioramonti y Ruckebusch,1976; Merino,1994). Según el último de estos trabajos, la excreción de heces duras es despreciable entre las 9:30 y las 17 h, periodo en que se produce la excreción de coprófagas, que alcanza un máximo a las 11 h, para luego disminuir hasta hacerse prácticamente nula a las 17 h, y más tarde reiniciar una nueva fase de excreción hacia las 6 h. La excreción de heces duras tiene lugar entre las 17 y las 8 h, presentando dos picos muy pronunciados, alrededor de las 22 h y alrededor de las 6 h (una hora y media antes de la claridad).

La **composición química** de ambos tipos de heces es diferente (**Tabla 1**). Las heces blandas son el resultado de la fermentación bacteriana del contenido cecal, por lo que su composición guarda una gran similitud con la de dicho contenido presentando, en general, más agua (menos MS), N, aminoácidos y vitaminas del complejo B, y menos fibra que las heces duras. El contenido en proteína de las heces blandas es del doble o más que el de las heces duras.

Tabla 1. Composición química comparativa de heces duras y heces blandas (%SMS), según autores.

HECES DURAS						HECES BLANDAS						Referencia
MS	PB	FB	FND	FAD	LAD	MS	PB	FB	FND	FAD	LAD	
-	9	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-	Björnhag (81)
-	-	-	78	47	11	-	-	-	45	26	5,8	Udén y Van Soest (82)
62,6	-	-	-	42,5	-	36	-	-	-	27,7	-	Fraga <i>et al.</i> (84)
52,7	15	30	-	-	-	38,6	25,7	17,8	-	-	-	Fekete y Bokori (85)
52	14,9	28,9	-	-	-	33,8	26,8	17	-	-	-	Carabaño <i>et al.</i> (88)
56,8	11,6	31	-	-	-	33	31	19	-	-	-	Lorente <i>et al.</i> (88)
66	12,8	38,5	75	50,7	19,5	42	29	22	44	30	12,5	Falcão e Cunha (88)
44	21	25	55,5	31,6	-	33,5	32	16	-	-	-	Pérez de Ayala (89)
44	17	36	60	41	-	31	35	-	-	-	-	Motta (90)

MS: Materia seca; PB: Proteína bruta; FB: Fibra bruta; FND: Fibra neutro-detergente; FAD: Fibra ácido-detergente; LAD: Lignina ácido-detergente.

II.1.5.2. Producción e importancia nutritiva de las coprófagas. Efecto sobre la digestibilidad.

La cantidad de coprófagas producida y su aporte a la MS y a la PB ingeridas son datos muy variables en la bibliografía (**Tabla 2**).

La cantidad de coprófagas excretada varía desde 10 hasta 36 g MS/d, con una media de $23,5 \pm 7,8$ g MS/d.

El aporte de las coprófagas al total de MS ingerida varía entre el 5 y el 26%, con una media del 13,8%, y el aporte de las coprófagas al total de PB ingerida varía, a su vez, entre el 12 y el 55%, con una media de 25,12%.

Tabla 2. Excreción de coprófagas y contribución relativa a la MS y a la PB ingeridas, según autores.

Referencia	Dieta	Cantidad (g MS/d)	Aporte a la MS ingerida (%)	Aporte a la PB ingerida (%)
Hörnigke (81)	-	-	5-18	-
Gidenne y Poncet (85)	25%FB; 11%LAD	-	15	23
Falcão e Cunha (88)	4%LAD 12%LAD	-	20,7 26,2	39 55
Gidenne y Lebas (87)	40% alfalfa	20-25	-	-
Gidenne (87)	↑ gradual LAD	31,5-36,1	20	29
Carabaño <i>et al.</i> (1988)	↑ gradual FAD	15-29,6	10,6-15,2	12,8-20,6
Lorente <i>et al.</i> (88) (1)	-	21,3	15,8	26,9
(2)	-	35,1	10,9	18,5
Carabaño <i>et al.</i> (89)	Alfalfa/Paja	18-21	12-13	18-19
Motta (90)	alfalfa	18	17,1	27
	PR-60	15,6	16,6	28,7
	OU-60	20	17,8	28,6
Fraga <i>et al.</i> (91)	alfalfa; PR; PC; OU;CA	10	11,6 (PC) 9,4 (alfalfa) 7,6 (los otros 3)	18,7 (PC) 12 (los demás)

(1) Hembras secas.

(2) Hembras en lactación.

PR:pulpa de remolacha; PC: pulpa de cítricos; OU: orujo de uva; CA: cascarilla de arroz.

Uno de los **factores** de esta **variación** es la metodología de obtención de los datos. La recogida de heces blandas requiere la colocación de un collar al conejo. La hora a la que éste se coloque y el estrés que produce a los animales pueden hacer variar los resultados obtenidos de unos trabajos a otros.

La edad y el estado fisiológico también son factores de variación. La producción y consiguiente ingestión de coprófagas en el conejo comienza a las 3 semanas, que es cuando el animal empieza a ingerir alimentos sólidos y cuando posee más flora cecal (Alus y Edwards, 1976), y va aumentando con la edad hasta alcanzar su máximo a las 9-11 semanas, coincidiendo con el periodo de máximo crecimiento, edad a la que la cantidad de coprófagas excretada se estabiliza en 20-25 g MS/d (Gidenne y Lebas, 1987). Según estos autores, ésto parece indicar que la coprofagia se realiza en función de las necesidades del organismo para el crecimiento. Así, después de las 11 semanas, (2,5 Kg), las necesidades del animal para crecer son menores que en etapas anteriores por lo que la producción de coprófagas se estabiliza. Sin embargo, otra posible causa es el aumento de la ingestión. De hecho, en situaciones fisiológicas especiales, como ocurre en las hembras en lactación, estos valores pueden alcanzar los 35,1 g MS/d, debido al aumento de la ingestión con respecto a las hembras gestantes y secas. Además, en las hembras en lactación la contribución de las coprófagas a la MS y PB ingeridas es menor que en las hembras secas. Así, los valores para la MS pueden disminuir del 15,8 al 10,9%, y para la PB del 26,9 al 18,5% (Lorente *et al.*, 1988).

El nivel y tipo de fibra de la dieta también influyen en la producción de coprófagas. Así, un aumento de FB del 5 al 24% implica un aumento significativo en la excreción, no encontrándose diferencias entre niveles de FB comprendidos entre el 9 y el 18% (Carabaño *et al.*, 1988).

En cuanto al tipo de fibra, los trabajos de Motta (1990) muestran que la sustitución del 20, 40 ó 60% de alfalfa por orujo de uva o por pulpa de remolacha, no varía significativamente la cantidad de coprófagas excretadas al día. Esta cantidad tampoco varía significativamente al sustituir el heno de alfalfa por otras fuentes de fibra (pulpa de remolacha, pulpa de cítricos, orujo de uva o cascarilla de arroz), según apuntan Fraga *et al.* (1991).

Los estudios del **efecto de la coprofagia sobre la digestibilidad de los nutrientes** han sido realizados mediante ensayos que impiden la realización de esta

práctica. La colocación de un collar de material ligero en el cuello del animal impidiendo la ingestión de las heces blandas desde el ano ha sido el método más utilizado. Generalmente se acepta que la digestibilidad total de la MS sufre una ligera disminución (6,5%) si se impide la coprofagia (Kennedy y Hershberger, 1974; Stephens, 1977; Fraga y De Blas, 1977; Fraga *et al.*, 1984; Robinson *et al.*, 1985, 1986a y 1986b; Raharjo *et al.*, 1990), aunque en 5 de las 22 dietas estudiadas no se observaron variaciones.

Para estos mismos autores, la digestibilidad total de la PB o del N sufre una disminución media del 15,5%, con valores que oscilan entre el 8 y el 22% cuando no se produce la coprofagia para las mismas 22 dietas estudiadas. Merino (1994), en animales canulados, observa también una disminución en la digestibilidad total de MS y de PB en los animales que no practican la coprofagia con respecto a los que sí la practican (la digestibilidad total de la MS disminuye un 11,24%, y la de la PB un 21,3%). Por otra parte, no encuentra diferencias significativas en la digestibilidad ileal ni de la MS ni de la PB, entre conejos con collar o sin él. Estos resultados indican que la coprofagia no afecta a la digestibilidad ileal, pero sí a la total (al menos en animales canulados).

El efecto de la coprofagia sobre la digestibilidad de la proteína depende de la fuente proteica de la dieta. Así, cuando la proteína de la dieta procede de forrajes, la importancia de la coprofagia es mayor, ya que cuando se impide su práctica se produce un 25% de disminución de la digestibilidad total de la PB. Cuando la proteína procede de dietas mixtas o concentrados la influencia es menor (produciéndose un 17 y un 13% de disminución, respectivamente). La coprofagia tiene, pues, más importancia cuando el animal se alimenta de forraje que cuando lo hace a base de concentrados.

Otra forma de cuantificar el efecto de la coprofagia se basa en la realización de ensayos con animales cecotomizados. Estudios recientes de Gralak *et al.* (1992) han mostrado, entre otros resultados, que la digestibilidad de la MS, de la PB y de la FND

descienden significativamente con la cecotomía (un 17, un 9 y un 25%, respectivamente).

Estos resultados indican, por tanto, que la coprofagia es esencial para obtener una máxima eficiencia digestiva en el conejo.

II.2. PREDICCIÓN DEL VALOR NUTRITIVO DE ALIMENTOS EN MONOGÁSTRICOS.

II.2.1. Introducción. Determinación de la digestibilidad *in vivo*. Inconvenientes que conducen a la predicción.

El objetivo principal de los estudios de fisiología digestiva es, en definitiva, caracterizar los alimentos como suministradores de nutrientes para cubrir las necesidades del animal, es decir, valorarlos y clasificarlos para así poder formular raciones equilibradas.

Tradicionalmente la valoración de alimentos se lleva a cabo mediante pruebas de digestibilidad *in vivo*, que es por ahora la mejor manera de estimar el valor nutritivo de los alimentos, ya que tienen en cuenta las pérdidas inevitables que se producen durante la digestión. La metodología de digestibilidad *in vivo* requiere el empleo de animales de experimentación a los que se suministra el alimento que se investiga y de los que se recoge la excreta fecal o ileal para cuantificar el aprovechamiento de los nutrientes (cantidad de un nutriente desaparecida en el tracto digestivo). Se requiere un número elevado de animales de experimentación ya que, aunque los animales sean de la misma especie y edad, presentan siempre diferencias en su capacidad digestiva lo que conlleva importantes variaciones individuales que hay que compensar. Se necesita, además, una gran cantidad del alimento a valorar, y disponer de los medios materiales y humanos necesarios. Son, por tanto, pruebas de elevado coste y de larga duración. Estas circunstancias suponen un inconveniente en la formulación práctica, donde se requieren métodos más rápidos. Además, la legislación es cada vez más

exigente en cuanto a la información requerida en la etiqueta de los alimentos destinados a los animales, con respecto a su composición química y características nutritivas. Por ello se necesitan técnicas de análisis rápidas y fiables.

Estos inconvenientes se han intentado subsanar mediante el empleo de métodos indirectos de valoración. Con ello se pretende valorar y predecir la digestibilidad y el valor nutritivo de los alimentos mediante simples pruebas de laboratorio, sin recurrir a los experimentos con animales. Una técnica de laboratorio suficientemente correlacionada con la utilización digestiva de los alimentos presenta indudables ventajas, en términos de reducción de costes, de estandarización de métodos y de aumento del número de alimentos estudiados y repeticiones efectuadas.

En este sentido, las ecuaciones de predicción según parámetros químicos han sido ampliamente utilizadas, ya que constituyen un método de valoración de alimentos que puede ser empleado de manera rutinaria en la formulación práctica, para dar recomendaciones concretas de una forma rápida. La predicción del valor nutritivo de los alimentos según su composición químico-bromatológica se estudia en el apartado **II.2.3.** de esta revisión.

Las técnicas de digestión *in vitro*, que también reducen la necesidad de llevar a cabo ensayos *in vivo*, constituyen una nueva forma de valoración de alimentos. Estas técnicas pueden ser también muy útiles en la práctica, bien para analizar los coeficientes de digestibilidad de las materias primas antes de formular un pienso de composición óptima, o bien para llevar a cabo un control de calidad de los piensos ya elaborados. Por otra parte, será cada vez más necesario, por motivos de bienestar animal y ética asociada a la experimentación, disponer de métodos *in vitro* (experimentos de digestión artificial) para la realización de ensayos experimentales, evitando que los animales se mantengan en condiciones que les provoquen stress. Los métodos de digestión *in vitro* para monogástricos se estudian en el apartado **II.2.4.** de esta revisión.

II.2.2. Criterios de elección de una ecuación de predicción.

La validez de una ecuación para predecir el valor nutritivo de piensos compuestos se debe testar teniendo en consideración una serie de criterios:

- la independencia entre las variables explicativas.
- el coeficiente de determinación (R^2) y la precisión del ajuste del modelo a los datos, expresado como la desviación residual estándar (drs).
- la facilidad para llevar a cabo los análisis químicos en un laboratorio de rutina así como el coste aceptable de los mismos.
- una baja variabilidad asociada a los análisis laboratoriales, expresada mediante unos índices de repetibilidad y de reproducibilidad aceptables.
- una alta capacidad predictora (robustez).

Normalmente, las ecuaciones de predicción que se proponen en la bibliografía tienen en cuenta los tres primeros puntos y descuidan, sin embargo, los dos restantes.

II.2.2.1. Incidencia de los errores analíticos en la precisión de las ecuaciones.

Sería conveniente tener en cuenta la incidencia de los errores analíticos en la precisión de las ecuaciones, con el fin de elegir aquellas variables predictoras cuya determinación presentase menor variabilidad. Esto, sin embargo, es algo que ningún trabajo de predicción de valor nutritivo de piensos para conejos tiene presente. La influencia de la variabilidad de los análisis sobre la precisión de los modelos de predicción del valor nutritivo de los alimentos ha sido, sin embargo, discutida por varios autores (Alderman, 1985; Pérez, 1990; Bailey y Henderson, 1990), en cerdos. Según estos trabajos, para evaluar el interés de un modelo de predicción, es necesario estimar su "error total de predicción" que es la resultante del error del ajuste de los datos experimentales (variación residual del modelo o drs) y el error ligado a los errores analíticos de cada variable explicativa (variación del análisis). Por tanto, es necesario conocer la variabilidad de los parámetros predictores que componen las ecuaciones. Esta variabilidad se puede expresar de dos maneras: como variación del

análisis dentro de un mismo laboratorio (índice de repetibilidad, r), o como variación del análisis entre laboratorios (índice de reproducibilidad, R), ambos expresados bien como desviación estándar (s_r y s_R) o como coeficiente de variación (CV_r y CV_R), de repetibilidad y de reproducibilidad, respectivamente. La forma que se utiliza normalmente para cuantificar la variabilidad del análisis en el error total de predicción es la s_R .

II.2.2.2 Índices de repetibilidad y de reproducibilidad.

La norma o estándar internacional ISO nº 5725-1986 define el índice de **repetibilidad (r)** (repetibilidad intra-serie, variabilidad del análisis), como el valor por debajo del cual se espera encontrar, con una probabilidad del 95%, la diferencia absoluta entre las dos réplicas que se hacen de una misma muestra, con una determinada técnica y bajo las mismas condiciones (el mismo laboratorio, aparatos, operario), en un intervalo corto de tiempo. Dicho valor (diferencia absoluta máxima) es, según esta norma, el límite superior del intervalo de confianza (IC) al 95% para la media de las diferencias, definido por la siguiente expresión matemática:

$$r = 2 * s_d = 2 * s \sqrt{2} = 2,83 * s \quad \text{donde:}$$

r = índice de repetibilidad

s_d = desviación estándar de la media de la muestra de diferencias entre las dos réplicas que se hacen de la muestra testigo a lo largo del tiempo, y calculada según la siguiente fórmula:

$$s_d = \sqrt{s_a^2 + s_b^2} = s\sqrt{2}$$

donde s_a^2 y s_b^2 son las varianzas de las 2 muestras, y se pueden considerar iguales (s^2).

Esta forma de cálculo ha sido utilizada en diversos estudios inter-laboratoriales (Van der Meer, 1984; A.O.A.C., 1988 (citado por Bailey y Henderson, 1990);

Muñoz,1991; Muñoz *et al.*,1994). Ahora bien, cabe pensar que esto es así sólo cuando el número de datos es lo suficientemente grande como para suponer una distribución normal de la población de diferencias, de media 0 y desviación típica conocida σ_d .

Sin embargo, estas presunciones, por lo general, no se cumplen. Normalmente se dispone de un número de datos que no es lo suficientemente grande como para presuponer que la población de diferencias sigue una distribución normal centrada en 0, y además, se desconoce su varianza, circunstancias que se dan en esta tesis. Por tanto, no parece correcto utilizar el límite superior de este IC para la media de la población de diferencias, como índice de repetibilidad. En todo caso, habría que dar los dos límites del IC.

Puesto que se trata de medidas pareadas, una vez comprobado que las diferencias entre las dos medidas pareadas siguen una distribución normal, lo correcto sería aplicar el test de Student de comparación de medias de dos variables normales, caso de muestras pareadas (Snedecor y Cochran,1971), para testar el siguiente contraste de hipótesis:

H_0 =la media de las diferencias es 0.

H_1 =la media de las diferencias es $\neq 0$.

con el estadístico:
$$t_{exp} = \frac{|\bar{d}| * \sqrt{n}}{s_d},$$
 donde:

\bar{d} = media de la muestra de diferencias.

n = número de pares de datos.

s_d = desviación estándar de la \bar{d} .

y dar el IC para la media de las diferencias.

Entre los trabajos consultados esta forma de cálculo sólo la utiliza Aufrère (1982). Por otra parte, Zaalberg (1989) presenta una forma alternativa a la norma ISO citada para calcular la repetibilidad. Esto requiere un debate por parte de los estadísticos para valorar las ventajas de cada una de ellas.

En cualquier caso, en la bibliografía consultada no queda muy claro cual debe ser el criterio adoptado para hallar el índice de repetibilidad. Comparar valores de r entre trabajos no resulta, pues, fácil. Es de esperar que en el futuro todos los trabajos presenten los resultados utilizando los mismos criterios de obtención de este índice, para poder comparar la precisión de métodos alternativos de valoración de alimentos.

El **índice de reproducibilidad (R)** está definido por la norma o estándar internacional ISO nº 5725-1986 como la variabilidad del análisis de una misma muestra, con una misma técnica, en distintas condiciones (distinto laboratorio, aparatos, operario). Se trata, por tanto, de una medida de la variabilidad de un análisis entre laboratorios.

En cuanto a la relación entre estos dos índices, la repetibilidad supone aproximadamente la mitad o las dos terceras partes de la reproducibilidad (Bailey y Henderson, 1990).

A continuación se recopilan valores de repetibilidad y de reproducibilidad encontrados en la bibliografía consultada.

La repetibilidad y la reproducibilidad de los distintos parámetros químicos que definen un pienso se han determinado en diversos estudios de colaboración entre laboratorios (Ring Tests). Así, Alderman (1985) presenta los valores de repetibilidad y de reproducibilidad del análisis de distintos parámetros químicos de 12 piensos compuestos, analizados en 16 laboratorios británicos (UKASTA/ADAS/COSAC). Los CV_r y los CV_R obtenidos figuran en la **Tabla 3**. Los valores de reproducibilidad que presentan Bailey y Henderson (1990) (**Tabla 3**) se obtuvieron también en Ring Tests llevados a cabo por este mismo equipo de trabajo. En ambos casos, los resultados indican una alta repetibilidad de todos los parámetros estudiados y una baja reproducibilidad de la FB y el EE ($CV_R \approx 5\%$). Los resultados de Muñoz (1991), que figuran también en la **Tabla 3**, son la media de los valores de reproducibilidad obtenidos en dos Ring Tests llevados a cabo en 1985 y en 1989 en los principales

laboratorios del grupo de trabajo del CIHEAM, sobre 8 y 5 materias primas (forrajes y sub-productos mediterráneos) para rumiantes, respectivamente. Como se puede apreciar, la determinación de los principales parámetros de la pared celular resulta muy poco reproducible (valores superiores a 7,6%, para la FB, FND y FAD). En una cadena de análisis interlaboratorial llevada a cabo posteriormente entre 16 laboratorios sobre 6 alimentos para rumiantes (Muñoz *et al.*, 1994), se obtuvo una precisión muy baja (repetibilidad y reproducibilidad) para todos los análisis realizados: cenizas, PB y FND (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de repetibilidad y de reproducibilidad (CV_r y CV_R , %) obtenidos en distintos trabajos.

a) de parámetros químicos.

Cenizas		PB		EE		FB		FND		FAD		Referencia
CV_r	CV_R	CV_r	CV_R	CV_r	CV_R	CV_r	CV_R	CV_r	CV_R	CV_r	CV_R	
1,14	2,82	1,02	2,94	2,65	5,55	1,72	5,67					Alderman (1985)
	2,6		1,6		5,0		4,9		2,3			Bailey y Henderson (1990)
	1,53		2,52				8,87		11,7		7,6	Muñoz (1991)
4,49	5,88	5,24	13,99					2,49	6,05			Muñoz <i>et al.</i> (1994)
							4,5				6,8	Pérez <i>et al.</i> (1995)

b) de métodos de digestibilidad *in vitro*.

pepsina/celulasa		FND/celulasa		Referencia
CV_r	CV_R	CV_r	CV_R	
1,95	9,15	1,69	6,47	Van der Meer (1984)
		0,70	1,47	Alderman (1985)
			2,00	Bailey y Henderson (1990)
	15,77			Muñoz (1991)
		2,38	13,81	Muñoz <i>et al.</i> (1994)

CV_r ; CV_R : Coeficientes de variación de repetibilidad y de reproducibilidad, respectivamente.

Más recientemente, Pérez *et al.* (1995) llevaron a cabo un Ring Test en 6 laboratorios europeos (entre los que nos incluimos), en 1993 para estudiar la variabilidad de los análisis de piensos para conejos. En este Ring Test se analizó la reproducibilidad del análisis de distintos parámetros químicos y de la digestibilidad de los nutrientes. Se analizaron dos piensos con distintos contenidos en fibra y se obtuvieron CV_R de 4,5% para la FB y de 6,8% para la FAD (**Tabla 3**), y mucho menores para las digestibilidades *in vivo* de la MS, MO, EB, PB y para la ED (1,1; 1,1; 1,6; 2,7 y 1,6%, respectivamente). Los CV_R para las digestibilidades de FB, FND y FAD fueron, sin embargo, muy elevados (22,1; 21,3 y 33,8%, respectivamente). Estos resultados indican, una vez más, una baja reproducibilidad de los análisis de las fracciones fibrosas de la pared celular, a pesar de que se realizan según unos métodos bien definidos y estandarizados desde hace mucho tiempo (Van Soest, 1963 y modificaciones).

En cuanto a la repetibilidad y la reproducibilidad de métodos de digestión *in vitro*, Van der Meer (1984) recopila los datos obtenidos en un Ring Test llevado a cabo entre 52 laboratorios, para estudiar la predicción de la digestibilidad de la MO de alimentos para rumiantes mediante métodos *in vitro*. En este estudio se analizaron 15 materias primas (concentrados y forrajes) mediante varios métodos enzimáticos, entre ellos uno a base de pepsina/celulasa y otro a base de FND/celulasa, y se obtuvieron los CV_r y CV_R para cada uno de los alimentos. En ambos métodos la repetibilidad fue aceptable en todos los laboratorios, para los 15 alimentos. Sin embargo, la comparación de los resultados obtenidos entre laboratorios fue insatisfactoria (**Tabla 3**). Así, en el método de pepsina/celulasa se obtuvieron unos CV_r comprendidos entre 0,73 y 3,43% (media = $1,95 \pm 0,84$) y unos CV_R entre 2,15 y 25,3% (media = $9,15 \pm 6,4$); y en el de FND/celulasa los CV_r estaban comprendidos entre 0,62 y 2,86% (media = $1,69 \pm 7,08$) y los CV_R entre 1,15 y 17,6% (media = $6,47 \pm 4,25$). En los Ring Tests referenciados por Muñoz (1991) y por Muñoz *et al.* (1994) los resultados están en la misma línea: buena repetibilidad (CV_r=2,38%) en el análisis FND/celulasa, y mala

reproducibilidad tanto en el método de FND/celulasa ($CV_R=13,81\%$) como en el de pepsina/celulasa ($CV_R=15,77\%$).

Los valores que dan Alderman (1985) y Bailey y Henderson (1990) referentes al método de FND/celulasa indican, por el contrario, una buena repetibilidad y reproducibilidad de esta técnica ($CV_r=0,7\%$ y $CV_R < 2\%$) (Tabla 3).

II.2.2.3. Robustez de un modelo de predicción.

Mediante el concepto de robustez de un modelo de predicción se evalúa su capacidad predictora, que debe ser tomada en cuenta a la hora de elegir una ecuación de predicción. Para ello es necesario extrapolar el modelo a diversas situaciones alimentarias distintas de las que sirvieron de base para elaborarlo y calcular los respectivos errores de predicción (%). Según apuntan Montgomery y Peck (1982) y Fuentes-Pila *et al.* (1995), un modelo es tanto más robusto cuanto menores son estos errores de predicción para el máximo número de situaciones distintas.

Una consideración global de todos estos criterios expuestos permite elegir las mejores ecuaciones de predicción.

II.2.3. Predicción del valor nutritivo de los alimentos para conejos según su composición químico-bromatológica.

II.2.3.1. Ecuaciones de predicción de la digestibilidad de la materia seca, de la materia orgánica, de la energía y de la energía digestible.

Una manera de estimar la energía digestible (ED) de los piensos para conejos ha sido hacerlo según su contenido en nutrientes digestibles (proteína digestible, fibra digestible, grasa digestible y ELN digestibles). En este sentido diversos trabajos han propuesto algunas ecuaciones de predicción (Nehring *et al.*, 1963 (citado por Maertens *et al.*, 1988); Jentsch *et al.*, 1963 (citado por Battaglini y Grandi, 1984); Schiemann *et al.*, 1972; Battaglini y Grandi, 1984). Este tipo de ecuaciones son poco útiles en la práctica, ya que requieren conocer los valores de digestibilidad *in vivo* de los

nutrientes y la composición química de los piensos. Esta razón ha conducido, en los últimos años, la valoración de alimentos hacia la obtención de ecuaciones de predicción basadas en parámetros químicos de la dieta.

La predicción del valor energético de las dietas a partir de su composición química, determinada analíticamente, tiene una importancia considerable. En primer lugar, supone un gran ahorro de tiempo al no requerir ensayos de digestibilidad; permite además llevar a cabo un control de calidad y, finalmente, podría simplificar el cumplimiento de la legislación venidera en lo referente a la obligatoriedad de declarar el valor energético de las dietas que suministra la industria de fabricación de piensos.

El valor energético de los alimentos para conejos se mide en términos de ED. Por ello, la mayoría de las ecuaciones pretenden predecir este parámetro. No obstante, diversos trabajos han comprobado que existe una estrecha relación entre ED, digestibilidad de la energía (dE), digestibilidad de la materia seca (dMS) y digestibilidad de la materia orgánica (dMO), por lo que en la bibliografía se encuentran también ecuaciones de predicción de las dE, dMS y dMO. En efecto, la correlación (R^2) entre la dE y la dMS es significativa y de 0,94 ó de 0,97, según Battaglini y Grandi (1984), con 29 datos, o según De Blas *et al.* (1984a), con 30 datos, respectivamente; y entre la dE y la dMO el R^2 es 0,96 en los dos trabajos. Asimismo, la dMS está muy correlacionada con la dMO ($R^2=0,98$) y en menor medida con la ED ($R^2=0,76$), según Battaglini y Grandi (1984). Más tarde, Ortiz y De Blas (1989), con 73 datos, obtienen también una alta correlación significativa ($R^2=0,99$; $drs=1,48$) entre dE y dMS, y entre dE y dMO ($R^2=0,95$; $drs=3$), esta última con 106 datos. En cerdos, Lekule *et al.* (1990) también han observado una gran correlación entre dMS y dE.

En los últimos años se han publicado trabajos que relacionan las dMS, dMO, dE, y la ED con uno o varios parámetros de composición química. Entre las ecuaciones de predicción del valor nutritivo de los piensos para conejos en base a la composición química, determinada analíticamente, destacan por su sencillez y por el número de piensos utilizado, las basadas en la fibra ácido-detergente (FAD) como única variable predictora. La relación negativa existente entre el contenido de FAD del

pienso y el valor nutritivo se explica claramente por la baja digestibilidad de dicha fracción fibrosa en el conejo (15-20%) que tiende a deprimir la digestibilidad de los demás componentes nutritivos de la dieta. El segundo principio nutritivo mejor correlacionado (también negativamente) es la fibra bruta, FB (Battaglini y Grandi, 1984; De Blas *et al.*, 1984a; Ortiz y De Blas, 1989; De Blas *et al.*, 1992). En otros trabajos (Maertens *et al.*, 1988; Pagano Toscano *et al.*, 1986), la FAD no resulta ser mucho mejor predictor que la FB, dada la alta correlación existente entre estos dos parámetros ($R^2=0,92$; $n=31$). De forma mucho menos importante se correlacionan negativamente la fibra neutro-detergente (FND), la lignina ácido-detergente (LAD) y la hemicelulosa y, positivamente, la proteína bruta (PB) y el extracto etéreo (EE), según el trabajo consultado, por lo que son indicadores muy poco precisos del valor energético.

En cuanto a la FND, las peores correlaciones obtenidas en conejos por Maertens *et al.* (1988) pueden ser debidas a que las ecuaciones se obtuvieron con pocos datos, ya que no era corriente realizar el análisis de FND. Posteriormente García *et al.* (1994) obtienen buenas correlaciones con FND para 40 muestras de heno de alfalfa ($R^2=0,72$). Esto indica que este parámetro de fibra podría ser tan buen predictor como la FAD o la FB, tal y como ocurre en cerdos.

Una recopilación de las principales ecuaciones de predicción, para piensos compuestos de conejos, basadas en un sólo parámetro químico de la pared celular, figuran en la **Tabla 4**. En general se obtienen correlaciones altamente significativas tanto con FAD como con FB, si bien la FAD explica mayor parte de la variabilidad de las variables que se predicen (más del 80%) que la FB (en torno al 70%). Además, según se desprende de los trabajos que dan la desviación residual estándar (drs), la precisión de las ecuaciones obtenidas es siempre peor con la FB.

La inclusión en la ecuación de predicción de dos o más parámetros químicos (regresión múltiple) supone, en general, un aumento de la precisión de la estimación del valor nutritivo. En particular, el contenido en EB de la dieta, medido en bomba calorimétrica, incluido junto con la FAD o con la FB, aumenta la correlación con la ED

($R^2 > 85\%$) y reduce el error de la estimación ($< 3,8\%$) (Maertens *et al.*, 1988; Corino, 1987). La EB es una variable que aporta siempre una contribución positiva al valor energético. Las ecuaciones propuestas por estos autores son las siguientes:

* Maertens *et al.* (1988):

$$ED \text{ (Kcal/Kg MS)} = -618 - 4,10 \text{ FB (g/Kg)} - 2,43 \text{ FAD (g/Kg)} + 1,03 \text{ EB (Kcal/Kg)}$$

$$R^2 = 0,90 \quad \text{drs} = 3,2 \quad n = 31$$

* Corino (1987):

$$ED \text{ (Kcal/Kg MS)} = 1512 - 52,21 \text{ FAD (\%)} + 0,49 \text{ EB (Kcal/Kg)}$$

$$R^2 = 0,85 \quad \text{drs} = 3,8 \quad n = 36$$

Esto, sin embargo, tiene el inconveniente de que no siempre se dispone de una de estas bombas en los laboratorios de análisis. En este caso, un resultado similar se puede conseguir incluyendo en la ecuación el contenido en PB o en EE (con signo positivo), tal y como apuntan Maertens *et al.* (1988):

$$ED \text{ (MJ/Kg)} = -7,54 + 29,71 \text{ PB (g/g)} + 50,25 \text{ EE (g/g)} + 23,39 \text{ ELN (g/g)}$$

$$R^2 = 0,90 \quad \text{drs} = 3,2 \quad n = 31$$

Esta última regresión resulta muy útil también, ya que tampoco requiere el análisis de la fracción fibrosa según Van Soest. Sin embargo, una de las limitaciones que presenta es que está basada en el contenido en extractivos libres de nitrógeno (ELN), y este parámetro no se puede aceptar pues se determina por diferencia y, por tanto, no es una variable independiente. Además, y debido también a su método de determinación, contiene los errores acumulados asociados a todos los análisis químicos. En otras ocasiones, la incorporación de más parámetros químicos (como variables independientes) en las ecuaciones basadas en FAD, sólo mejora muy levemente la precisión de las predicciones (De Blas *et al.*, 1992).

Estas regresiones lineales simples o múltiples, que pueden considerarse válidas para la mayoría de los piensos "normales" de conejos (formulados con las materias primas habituales y con una digestibilidad de la fibra normal), no deben ser utilizadas para predecir el valor energético de dietas que contienen alimentos con fibra altamente digestible, en cantidad mayor de un 30%, (por ejemplo, pulpa de remolacha y de

cítricos), o ricas en grasa añadida (por el efecto favorable que tiene sobre la digestibilidad), ya que conducirían a importantes errores de estimación, concretamente subestimarían el contenido en ED de dichos piensos.

Tabla 4. Ecuaciones de regresión para predecir la digestibilidad de la materia orgánica (dMO), de la energía (dE) y la energía digestible (ED) de piensos para conejos con parámetros de la pared celular, según autores.

y	a	b x	n	R ²	drs	Referencia
dMO (%)	93,02	-1,60 FB (%)	53	0,76***	-	Pagano Toscano <i>et al.</i> (1984)
dE (%)	87,34	-1,28 FAD (%) (± 0,17)	29	0,65***	-	Battaglini y Grandi (1984)
dE (%)	79,51	-1,21 FB (%) (± 0,28)	29	0,42***	-	Battaglini y Grandi (1984)
dE (%)	84,77	-1,16 FAD (% SMS)	73	0,82***	-	De Blas <i>et al.</i> (1984a)
dE (%)	84,93	-1,13 FAD (% SMS) (± 0,04)	175	0,80***	4,21	Ortiz y De Blas (1989)
dE (%)	84,02	-1,42 FB (% SMS) (± 0,06)	219	0,71***	6,02	Ortiz y De Blas (1989)
dE (%)	86,3	-1,2 FAD (% SMS) (± 0,1)	66	0,89***	2,2	De Blas <i>et al.</i> (1992).
dE (%)	87,8	-1,13 FAD (% SMS) (± 0,1)	93	0,76***	3,8	De Blas <i>et al.</i> (1992).
ED (%EB)	92,35	-1,47 FAD (% SMS)	38	0,62	8,1	Battaglini y Grandi (1986)
ED (MJ/Kg)	13,5	- 18,1 FAD (g/g)	31	0,76**	4,7	Maertens <i>et al.</i> (1988)
ED (MJ/Kg)	13,7	- 24,7 FB (g/g)	31	0,72**	5,11	Maertens <i>et al.</i> (1988)

***: p<0,001 **: p<0,01

Tampoco deben utilizarse para estimar el valor nutritivo de este tipo de materias primas. A esta conclusión han llegado diversos autores (De Blas *et al.*, 1984a y 1992; Maertens *et al.*, 1988; Ortiz y De Blas, 1989). Así, el último de estos trabajos (De Blas *et al.*, 1992) propone una ecuación general con 66 datos tras comprobar que la exclusión de las dietas con pulpas, con grasa añadida y con un contenido en paja superior al 20% mejoraba significativamente la predicción (**Tabla 4**). Estos mismos autores proponen diversas ecuaciones de predicción específicas para cada grupo de piensos en particular:

- Para dietas con grasa añadida (n=25):

$$dE (\%) = 79,7 - 1,1 (\pm 0,1) FB (\% \text{ SMS}) \quad R^2=0,75^{***} \quad drs=1,8$$

En este caso la FB se correlacionó mejor que la FAD ($R^2=0,68$).

- Para dietas con pulpa de remolacha (n=10):

$$dE (\%) = 94 - 1,3 (\pm 0,2) FAD (\% \text{ SMS}) \quad R^2=0,85^{***} \quad drs=2,7$$

- Para dietas con pulpa de cítricos (n=7):

$$dE (\%) = 96,6 - 2,3 (\pm 1,1) FB (\% \text{ SMS}) \quad R^2=0,47 (p=0,091) \quad drs=4,6$$

También en este caso la FB se correlacionó mejor que la FAD.

- Para dietas con un contenido en paja mayor del 20% (n=25):

$$dE (\%) = 94,2 - 1,7 (\pm 0,2) FAD (\% \text{ SMS}) \quad R^2=0,84^{***} \quad drs=3,7$$

Los parámetros químicos de la pared celular no tienen en cuenta las interacciones que sin duda existen entre el alimento y la fisiología digestiva del animal, lo que en ocasiones conduce a una mala estimación de su valor nutritivo.

Las ecuaciones obtenidas para piensos no sirven para estimar el valor nutritivo de alimentos simples, siendo necesario obtener ecuaciones particulares para cada grupo de materias primas.

En la bibliografía consultada no se encuentran muchos trabajos que propongan ecuaciones de predicción para materias primas. Fekete y Gippert (1986) determinaron la digestibilidad aparente de los nutrientes y la ED de materias primas (granos de cereales, subproductos de molinería, fuentes de proteína y alimentos fibrosos),

mediante ensayos de digestibilidad por el método de sustitución del 40% en una dieta basal. Relacionando la ED estimada mediante la ecuación de Schiemann *et al.* (1972) (en función de los nutrientes digestibles) con parámetros químicos obtuvieron la siguiente ecuación de predicción de la ED:

$$ED \text{ (Kcal/Kg MS)} = 4253 - 32,6 \text{ FB (\%)} - 114,4 \text{ cenizas (\%)} \quad R^2=0,75^{***} \quad n=19$$

Teniendo en cuenta que el contenido en FB y en cenizas de las materias primas valoradas presentó un amplio rango de variación (de 0,9 a 33% y de 1,1 a 10,7%, respectivamente), y también la ED (de 1238 a 4119 Kcal/Kg MS), los citados autores recomendaron el uso de esta ecuación en la práctica.

El trabajo más reciente sobre predicción de dE y de ED de materias primas es el de Wiseman *et al.* (1992). Estos autores, aunando las materias primas valoradas *in vivo* en otros trabajos (Maertens y De Groote, 1984 y Villamide, 1989), obtienen las mejores ecuaciones de predicción en función de la FB:

$$dE \text{ (\%)} = 87,1 - 1,5 (\pm 0,12) \text{ FB (\% sMS)}$$

$$R^2=0,84^{***} \quad drs=8,6 \quad n=31$$

$$ED \text{ (MJ/Kg)} = 17,08 - 0,03 (\pm 0,0031) \text{ FB (g/KgMS)}$$

$$R^2=0,76^{***} \quad drs=2,28 \quad n=31$$

A continuación dividen el conjunto de datos total en varios grupos: concentrados proteicos (n=11); concentrados de energía (n=6); alimentos ricos en fibra (n=6) y alimentos con un contenido de proteína y fibra semejante (n=8). Las ecuaciones obtenidas para cada grupo individual resultan peores que para el total de los datos, si bien esto es debido, según los autores, al escaso número de datos de cada grupo de alimentos, por lo que los resultados de este trabajo no son concluyentes, quedando pendiente la obtención de ecuaciones con un número de datos mayor.

Otros trabajos han estudiado el efecto de la composición química sobre el valor energético de distintos henos de alfalfa, comprobando que depende estrechamente de los constituyentes parietales. Así, Pérez (1994) obtiene una alta correlación ($R^2=0,83$)

entre la ED y la FB, en 12 muestras de amplio rango de PB y FB y García *et al.* (1994) obtienen un valor de $R^2=0,72$, entre ED y FND, con 5 muestras.

II.2.3.2. Ecuaciones de predicción de la digestibilidad de la proteína.

La predicción de la digestibilidad de la proteína bruta (dPB) según parámetros químicos se ha tratado en pocos trabajos. En general no se obtienen buenas correlaciones con ningún componente químico. Así, Battaglini y Grandi (1984), con 29 piensos, al relacionar la dPB con distintos parámetros de la pared celular, sólo encuentran cierta correlación negativa con la LAD ($R^2=0,48$) y positiva con la FND ($R^2=0,15$), no siendo significativa la correlación ni con la FB ni con la FAD.

De Blas *et al.* (1984b) obtienen una ecuación de predicción de la dPB basada en la proporción de proteína de concentrados sobre el contenido total de proteína de la dieta (cP) sin que ninguna otra variable (FAD y PB) se incluya en un análisis de regresión paso a paso. La ecuación es la siguiente:

$$\text{dPB (\%)} = 56,48 + 18 \text{ cP (\%)} \quad R^2=0,42^{***} \quad n=35$$

Sin embargo, Fekete y Gippert (1986) obtienen una buena predicción de la dPB en función del contenido en PB y en cenizas de las 19 materias primas estudiadas:

$$\text{dPB (\%)} = 0,803 - 0,558 \text{ cenizas (\%)} + 0,855 \text{ PB (\%)} \quad R^2=0,92^{***} \quad n=19$$

II.2.3.3. Ecuaciones de predicción de la digestibilidad de la fibra.

Si para predecir la dPB son muy pocas las ecuaciones existentes, para predecir la digestibilidad de la fibra aún hay menos.

Battaglini y Grandi (1984) no encuentran correlación entre la digestibilidad de la fibra bruta (dFB) y ningún parámetro químico de la pared celular (únicamente con la LAD, $R^2=0,14$).

Pérez de Ayala *et al.* (1991), con 5 dietas propias y 42 de otros trabajos, obtienen ecuaciones para predecir la fibra bruta indigestible (FBI). Estos piensos están formulados reemplazando parte del heno de alfalfa por otras fuentes de fibra (pulpa de

remolacha, pulpa de cítricos, orujo de uva y cascarilla de arroz). En un análisis de regresión paso a paso incluyendo todos los parámetros de la pared celular como variables independientes, obtienen la siguiente ecuación:

$$\text{FBI (\% MS)} = -0,99 + 0,82 (\pm 0,07) \text{ FB (\% SMS)} \quad R^2=0,73^{***} \quad n=47$$

Al considerar, además, los niveles de inclusión de heno de alfalfa, pulpas o fibras muy lignificadas, la ecuación obtenida es:

$$\text{FBI (\% MS)} = 0,64 + 0,74 (\pm 0,06) \text{ FB (\% MS)} - 0,064 (\pm 0,01) \text{ Pu} \quad R^2=0,81^{***} \quad n=47$$

siendo Pu, el nivel de inclusión de pulpa en la dieta (%).

II.2.4. Los métodos de digestión *in vitro* en monogástricos.

II.2.4.1. Introducción y objetivos.

Para tratar de subsanar los errores de predicción de las ecuaciones basadas en parámetros químicos, y que se deben fundamentalmente a las interacciones del alimento con la fisiología digestiva del animal; y teniendo como base la experiencia acumulada en el sector de los rumiantes, se ha considerado de interés la puesta a punto de métodos enzimáticos de laboratorio, métodos *in vitro*, dirigidos a reproducir los procesos digestivos que tienen lugar en los animales monogástricos. En alimentación porcina y en avicultura se han llevado a cabo numerosos trabajos de investigación en este campo, pero por el momento se ha prestado poca atención a este aspecto científico en conejos.

Los métodos de digestión *in vitro* persiguen, en general, dos objetivos distintos, aunque normalmente compatibles: por un lado, pretenden **reproducir** total ó parcialmente **la digestión** que lleva a cabo el animal y, por otro, **predecir el valor nutritivo de los alimentos**.

La digestión es un proceso dinámico e integrado, sometido a control hormonal y nervioso que responde a distintos estímulos. Reproducir tan complejo sistema en el laboratorio resulta muy difícil, y requiere que se tengan en cuenta los múltiples factores

que afectan a la digestión. Sin embargo, ésto no debe invalidar los intentos de modelizar *in vitro* el sistema de la digestión del animal, ya que los modelos siempre son buenas herramientas aunque sean simples y no reproduzcan exactamente el sistema que pretenden representar. En cualquier caso, todo modelo de laboratorio supone una simplificación de la realidad y permite definir y controlar las condiciones experimentales mejor de lo que normalmente es posible *in vivo*, por lo que puede ser de gran utilidad para la realización de estudios fisiológicos.

La otra finalidad de los métodos *in vitro* es predecir el valor nutritivo de los alimentos. En efecto, puede simplemente interesar correlacionar bien los datos obtenidos *in vitro* con los obtenidos *in vivo*, y conseguir buenas ecuaciones de predicción. Interesan, en este sentido, los métodos sencillos, precisos, rápidos, baratos y robustos, constituyendo, los métodos de digestión *in vitro*, una opción interesante para conseguirlo.

En definitiva, es importante predecir, pero parece lógico pensar que cuanto más fielmente se simule la digestión de la especie animal en cuestión, mejores predicciones se obtendrán. Por consiguiente el doble objetivo de los métodos *in vitro* debe ser "predecir simulando".

II.2.4.2. Clasificación.

Con objeto de simplificar la revisión bibliográfica, únicamente se citarán dos de las posibles clasificaciones de los métodos enzimáticos de digestión *in vitro* en monogástricos:

- una primera clasificación, de acuerdo con el apartado **II.2.4.1.**, se hace según el objetivo que persiguen: reproducir, predecir o ambos, y
- una segunda clasificación, en función de los pasos que se requieren para imitar la digestión. Un esquema general de los distintos métodos multi-enzimáticos de digestión *in vitro* se presenta en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Métodos multi-enzimáticos de digestión *in vitro*

Métodos de un paso:

Fluidos intestinales

Métodos de dos pasos:

Pepsina-fluido yeyunal

Pepsina-fluido ileal

Pepsina-pancreatina

Métodos de tres pasos:

Pepsina-pancreatina-fluido ruminal

Pepsina-pancreatina-enzimas degradadoras de la fibra

En los siguientes apartados (II.2.4.4., II.2.4.5. y II.2.4.6.) se revisan los principales trabajos que presenta la bibliografía en cerdos y aves, siguiendo, en principio, la segunda de estas clasificaciones, pero sin olvidar los objetivos de cada método *in vitro* empleado. La revisión bibliográfica de los métodos de digestión *in vitro* en conejos se lleva a cabo en el apartado II.2.4.7.

Se puede decir, en líneas generales, que en principio los métodos de digestión *in vitro* han querido reproducir la digestión total, bien con uno, dos o tres pasos; y que posteriormente se ha comenzado a considerar la digestión pre-cecal o ileal. Así, últimamente, la mayor parte de la investigación llevada a cabo en **cerdos** se ha encaminado hacia las técnicas *in vitro* de digestibilidad ileal, con el fin de sustituir los ensayos de digestibilidad con animales canulados en íleon. Se ha prestado especial atención a la predicción de la digestibilidad ileal del N y de los aminoácidos, sobre todo de materias primas. Con ello se ha perseguido valorar la calidad de la proteína en función de la disponibilidad de sus aminoácidos. Este sigue siendo el principal objetivo de la investigación en cerdos, ya que es un tema que tiene cada vez más relevancia. La valoración de la disponibilidad de aminoácidos *in vivo* mediante análisis de contenidos intestinales no es fácil y se obtienen resultados difíciles de interpretar: primero, porque los aminoácidos digeridos se absorben rápidamente en el intestino, y segundo, porque hay contaminación endógena por lo que no se puede saber a ciencia

cierta qué aminoácidos proceden de la dieta y cuáles del N endógeno. Para evitar estos problemas se proponen métodos *in vitro*.

Sin embargo, dada la importancia que tiene en los cerdos la digestión en el intestino grueso, muchas técnicas se han completado con el fin de obtener valores de digestibilidad *in vitro* total y poder predecir la digestibilidad fecal o total de dietas y materias primas.

La mayoría de los métodos *in vitro* se basan en un número de datos pequeño, por lo que no son métodos de predicción aunque casi todos los trabajos presenten alguna ecuación. Sí sirven, sin embargo, como métodos de simulación de la fisiología digestiva del animal permitiendo valorar la importancia de los distintos pasos de la digestión. Únicamente sirven para predecir los trabajos basados en un número suficiente de datos.

La investigación en **aves** se ha llevado a cabo utilizando métodos de digestión *in vitro* desarrollados previamente para cerdos. Se ha comprobado que es posible simular la digestión total de las aves con métodos de dos pasos (pepsina-fluido yeyunal porcino o pepsina-pancreatina), ya que las aves presentan muy poca fermentación en el intestino grueso. Además se ha comprobado que se puede utilizar un mismo método para especies tan distintas como cerdos y aves, y probablemente también para otras especies de monogástricos.

II.2.4.3. Metodología de las técnicas multi-enzimáticas de digestión *in vitro* en monogástricos.

Algunos de los trabajos consultados llevan a cabo estudios metodológicos sobre las condiciones experimentales de las técnicas de digestión *in vitro*, con el fin de determinar las fuentes de variación que pueden afectar a los resultados obtenidos (digestibilidad *in vitro* de la MS). Factores como la preparación de la muestra, las proporciones de enzima y sustrato, las condiciones de pH y temperatura del medio de

incubación y el tiempo de incubación en cada fase son los que se estudian principalmente.

En cuanto a la preparación de la muestra, hay que tener en cuenta el tamaño de partícula y el tamaño de muestra. En general, la criba comúnmente utilizada para moler las muestras es de 1 mm de diámetro (Furuya *et al.*,1979; Clunies y Leeson, 1984; Graham *et al.*,1989; Vervaeke *et al.*,1989; Boisen y Fernández,1991a; Van der Meer y Pérez,1992; Cone y Van der Poel,1993). Según algunos trabajos, con moliendas más finas se obtienen valores significativamente mayores de digestibilidad *in vitro* de la MS. Así, según Clunies y Leeson (1984), hay diferencias al pasar de 0,84 a 0,40 mm, correlacionándose mejor con los valores *in vivo* los datos obtenidos con la molienda más fina. En otros trabajos (Löwgren *et al.*,1989), sin embargo, no se encuentran diferencias entre una molienda de 0,5 mm y una de 1 mm, pero sí cuando es de 2 mm y de 5 mm, obteniéndose digestibilidades *in vitro* menores cuanto más gruesa es la molienda. Sin embargo, Xia y Hall (1987), al comparar una molienda gruesa (4 mm) con una fina (0,75 mm), no obtienen diferencias significativas en los valores de digestibilidad *in vitro*. En definitiva, 1 mm es el tamaño de criba que se utiliza normalmente para las técnicas *in vitro* pues es el utilizado para el análisis rutinario de alimentos.

En cuanto al tamaño de muestra, es corriente la utilización de 1 g (Babinszky *et al.*,1990; Boisen y Fernández,1991a; Cone y Van der Poel,1993) ó de 0,5 g (Clunies y Leeson,1984; Metz y Van der Meer,1985; Löwgren *et al.*,1989; Graham *et al.*,1989; Valdés y Leeson,1992; Van der Meer y Pérez,1992). Algunos trabajos indican la obtención de valores de digestibilidad *in vitro* de la MS significativamente mayores con 0,5 g que con 1 g, y más cercanos a los valores *in vivo* (Furuya *et al.*,1979; Xia y Hall,1987; Llopis y Fernández Carmona,1992). No obstante, los trabajos de predicción utilizan, en general, 1 g ya que ello permite tomar una muestra representativa del alimento a valorar y así reducir la variabilidad del análisis. Además se obtienen mejores correlaciones con los valores *in vivo* que si se utilizan otros tamaños de muestra.

Tipo de enzimas y proporción de enzima/sustrato utilizados en cada paso. La elección de las enzimas es un factor muy importante a tener en cuenta en los métodos de digestión *in vitro*. Se deben utilizar las existentes en el tracto digestivo del animal. En general, en todos los métodos se utilizan preparados enzimáticos similares, que presentan una composición definida y constante, ya que están purificados, y son de fácil adquisición en distintas casas comerciales. La **pepsina** (preparado enzimático comercial purificado de mucosa gástrica porcina, con actividad proteolítica) y la **pancreatina** (preparado comercial purificado de extracto de páncreas porcino con actividad amilásica, lipásica y proteásica), usados en la mayoría de los trabajos, sirven para llevar a cabo una predigestión de la proteína y para hidrolizar los nutrientes potencialmente digestibles (almidón, lípidos y proteínas), respectivamente. Mezclas de distintas hidrocarbonasas (celulasa, hemicelulasa, arabinasa, xylanasa, β -glucanasa y pectinasa), obtenidas a partir de hongos, como el **Viscozyme**, o bien hidrocarbonasas aisladas, como la **Celulasa**, llevan a cabo la degradación de la fibra.

No se ha prestado mucha atención al estudio de la elección del complejo enzimático óptimo a utilizar, ya que se han utilizado los existentes en el mercado. En cuanto a la elección de la concentración enzimática óptima, o de la relación enzima-sustrato, cada nuevo trabajo se basa sistemáticamente en trabajos previos y elige en función del tamaño de muestra, de la actividad específica del enzima y del tiempo de incubación que utilice. Esta relación es, por tanto, distinta según el trabajo consultado, lo que dificulta la comparación entre trabajos.

El pH de cada periodo de incubación ha de elegirse, en principio, de acuerdo con el que presenta cada compartimento digestivo del animal. Es necesario, además, ajustarlo al pH óptimo de actuación de las enzimas que se utilicen con el fin de que la acción enzimática sea más rápida. Por ello, a veces ambos valores de pH no se corresponden. Así, el pH de la incubación con pepsina se ajusta a 1 (Metz y Van der Meer, 1985; Babinszky *et al.*, 1990); a 1,5 (Van der Meer y Pérez, 1992) ó a 2 (Gauthier *et al.*, 1986; Boisen y Fernández, 1991a) y el de la incubación con pancreatina, a 6,8 (Babinszky *et al.*, 1990; Boisen y Fernández, 1991a; Van der Meer y Pérez, 1992; Cone

y Van der Poel,1993) o a 7,5 (Dierick *et al.*,1985; Gauthier *et al.*,1986; Vervaeke *et al.*,1989), que son valores fisiológicos. El pH óptimo para la digestión de la fibra es de 6,6 a 7, siendo el que utilizan los métodos con fluidos intestinales (Clunies y Leeson,1984; Xia y Hall,1987; Vervaeke *et al.*,1989), comprobándose, además, que por debajo de este valor se aprecian diferencias significativas en las digestibilidades *in vitro*. Sin embargo, el pH que se utiliza en la fase de incubación del sustrato con enzimas degradadoras de la fibra no se corresponde con el fisiológico, ya que estas enzimas no proceden de los microorganismos del tracto gastro-intestinal del animal, sino de mohos, y suele ser de 4,8 ó 5, que es el pH óptimo de actividad de estas enzimas (Metz y Van der Meer,1985; Boisen y Fernández,1991a; Van der Meer y Pérez,1992).

El pH va cambiando durante la incubación por lo que es necesario incorporar soluciones tampón para mantenerlo estable según apuntan Clunies y Leeson (1984), Xia y Hall (1987) o Boisen y Fernández (1991a).

De la misma manera, la temperatura de cada fase de la técnica se debe elegir tomando como referencia la del cuerpo del animal cuya fisiología digestiva se pretende simular y procurando que se ajuste a los requerimientos enzimáticos. Temperaturas de 37 a 40°C son las habitualmente utilizadas, no siendo recomendable aumentar la temperatura por encima de este valor (Furuya *et al.*,1979; Clunies y Leesson,1984; Metz y Van der Meer,1985; Dierick *et al.*,1985; Vervaeke *et al.*,1989; Babinszky *et al.*,1990; Boisen y Fernández,1991a; Van der Meer y Pérez,1992; Llopis y Fernández Carmona,1992; Cone y Van der Poel,1993).

La duración de las incubaciones varía, según autores, en cada fase de la técnica. En general se pretenden ajustar a los TMR en los distintos compartimentos digestivos, sobre todo cuando la finalidad que se persigue es simular. Sin embargo, cuando el objetivo es predecir, se hace necesario agilizar los tiempos de incubación, además de adecuar la técnica al horario de trabajo normal de un laboratorio. Por eso muchas veces los tiempos de incubación no se corresponden con los TMR fisiológicos,

y se modifican las concentraciones enzimáticas utilizadas en función de los tiempos de incubación que se empleen.

La duración de la incubación con pepsina/HCl varía según el trabajo consultado, oscilando entre 30 min (Gauthier *et al.*, 1986); 1-1,5 h (Metz y Van der Meer, 1985; Babinszky *et al.*, 1990; Van der Meer y Pérez, 1992; Cone y Van der Poel, 1993); 2 h (Clunies y Leeson, 1984; Boisen y Fernández, 1991a); 4 h (Furuya *et al.*, 1979; Clunies y Leeson, 1984; Dierick *et al.*, 1985; Xia y Hall, 1987; Vervaeke *et al.*, 1989; Valdés y Leeson, 1992) y 6 h (Büchmann, 1979; Llopis y Fernández Carmona, 1992). Este margen tan amplio se debe, por un lado, a las distintas concentraciones enzimáticas o a las diferentes actividades específicas de las enzimas utilizadas, y por otro, a los objetivos finales que persigue cada trabajo.

Un aumento del tiempo de incubación de 30 min a 3 h no modificó significativamente la cantidad de N dializado según la técnica de Gauthier *et al.* (1986), quizás porque llega un momento en que se alcanza una concentración en productos de la digestión a la cual la pepsina ya no actúa. Según Furuya *et al.* (1979), un periodo de incubación entre 2 y 6 h en su ataque con pepsina, no varía la digestibilidad *in vitro* de la MS ni de la PB, y tampoco varían si la incubación con pepsina se prolonga más de 2 h, según apuntan Clunies y Leeson (1984).

En cuanto a la utilización de fluidos digestivos o enzimas comerciales para simular la digestión en el intestino delgado, la incubación con fluido de yeyuno de cerdo dura 4 h (Furuya *et al.*, 1979; Dierick *et al.*, 1985). En aves, Clunies y Leeson (1984), tomando como base los trabajos de Furuya *et al.* (1979), utilizan también fluido de yeyuno porcino, y usan un tiempo parecido (3 h). Esto indica que el tiempo depende más de la actividad específica de las enzimas del fluido que del tiempo de retención fisiológico de las aves.

La incubación con pancreatina dura 1 h (Metz y Van der Meer, 1985; Babinszky *et al.*, 1990; Van der Meer y Pérez, 1992; Cone y Van der Poel, 1993); 4 h (Clunies y Leeson, 1984; Dierick *et al.*, 1985; Vervaeke *et al.*, 1989; Boisen y Fernández, 1991a); 6

h (Gauthier *et al.*, 1986; Valdés y Leeson, 1992) ó 18 h (Büchmann, 1979; Llopis y Fernández Carmona, 1992).

La incubación con fluido ileal para simular la digestión total tiene una duración de 48 h (Xia y Hall, 1987). Un tiempo similar se emplea cuando se utiliza fluido ruminal (Vervaeke *et al.*, 1989). Según Furuya *et al.* (1979), un aumento del tiempo de incubación de 4 a 6 h con fluido de yeyuno no varía la digestibilidad *in vitro* de la MS ni de la PB. Los resultados de Clunies y Leeson (1984) indican que no hay diferencias significativas en digestibilidad de MS ni de PB si la incubación con fluido de yeyuno dura más de 3 h.

Boisen y Fernández (1991a) eligen unos tiempos de incubación de 2 y 4 h, con pepsina y pancreatina, respectivamente, tras comprobar que los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS no difieren significativamente con respecto a tiempos de incubación más prolongados (6 y 18 h, respectivamente).

La duración de la tercera fase varía según el trabajo consultado. Así, es de 48 h si se utiliza contenido cecal (Llopis y Fernández Carmona, 1992); de 18 h si se emplea el preparado enzimático comercial Viscozyme (Boisen y Fernández, 1991a) o de 2 h si el preparado utilizado es Celulasa (Metz y Van der Meer, 1985; Van der Meer y Pérez, 1992). Esta gran diferencia de tiempo de incubación entre los preparados comerciales utilizados se debe, fundamentalmente, a un intento de ajustar las técnicas (que se componen de éste y otros pasos previos), al horario laboral de cada laboratorio. Para ello se modifica la concentración enzimática utilizada según las necesidades prácticas.

Las técnicas de un sólo paso, desarrolladas para simular la digestión del cerdo, por Löwgren *et al.* (1989) y por Graham *et al.* (1989), emplean un tiempo de incubación de 12 h para representar la digestión pre-cecal con fluido duodenal y de 48 h si se quiere simular la digestión total con fluido ileal o con extracto de heces.

Los trabajos consultados utilizan indistintamente baño de incubación a temperatura constante o estufa termoestable de ventilación forzada, pues se obtienen resultados similares, según comprueban Boisen y Fernández (1991a y b).

Mantienen una agitación constante, eventual o incluso no agitan, pues generalmente se admite que no es necesaria la agitación durante las incubaciones, ni siquiera con sustratos insolubles (Nefzaoui y Vanbelle, 1984).

Algunos, tras la filtración, hacen varios lavados con etanol y acetona, para arrastrar la grasa y los azúcares de bajo peso molecular (Metz y Van der Meer, 1985; Boisen y Fernández, 1991b).

Algunas técnicas incorporan un antibiótico para prevenir el crecimiento microbiano. Así, Boisen y Fernández (1991a y b) añaden cloranfenicol, tras comprobar que no interfiere con la digestión *in vitro* ni con los análisis subsiguientes; Gauthier *et al.* (1986) emplean Thimerosal, y Buchman (1979) utiliza un buffer bacteriostático.

II.2.4.4. Métodos *in vitro* de digestibilidad de la MS y MO, con enzimas endógenas de estómago e intestino delgado.

Ecuaciones de predicción de la digestibilidad ileal y fecal de la MS, MO y energía, para cerdos y aves.

Los métodos de digestibilidad *in vitro* en los que se utilizan enzimas endógenas de estómago e intestino delgado son métodos multi-enzimáticos que tratan de reproducir la digestión pre-cecal y, en algunos casos, también de predecir la digestibilidad de la MS, MO y energía a nivel ileal. Algunos, sin embargo, la que pretenden predecir es la digestibilidad total. Constan de una sola incubación (métodos de un paso) o de dos incubaciones sucesivas (métodos de dos pasos) de las muestras con distintos preparados enzimáticos o fluidos intestinales (**Cuadro 1**). Posteriormente analizan el residuo no digerido recogido por filtración.

Algunos de los trabajos en que se utilizan estas técnicas son de metodología, basándose en un número pequeño de datos. Su utilidad para predecir quedaría, pues, pendiente de que fueran testados en un número suficiente de muestras. Otros, sin embargo, obtienen buenas ecuaciones de predicción.

Los métodos de dos pasos son los que más fielmente reproducen la realidad de la digestión pre-cecal. Todos incluyen una primera incubación con una solución de

pepsina en HCl diluido, utilizando bien algún fluido intestinal o bien pancreatina en el segundo paso, según los distintos trabajos consultados. Se utiliza pepsina por ser la principal enzima proteolítica presente en el jugo gástrico y porque es relativamente barata y de fácil adquisición comercial. La solución de HCl (también de fácil adquisición comercial) reproduce el medio ácido del estómago, y la combinación de ambos lleva a cabo una primera ruptura del material proteico, además de una predigestión de las paredes celulares haciéndolas más accesibles a las enzimas degradadoras de la fibra (Dowman y Collins, 1982). Aunque no está muy claro las reacciones que tienen lugar, hay más evidencia de que es el ácido más que la pepsina directamente, el que provoca la apertura de la estructura de la celulosa permitiendo que las enzimas penetren en ella, como apuntan Kirchgessner y Kellner (1978), citado por Dowman y Collins (1982). La importancia de la pepsina ha sido constatada también por Camus y Laporte (1980). Estos autores comprueban que la predigestión de la caseína y del gluten con pepsina durante 1 h facilita la posterior hidrólisis por las enzimas pancreáticas, ya que aumenta la solubilidad de la proteína y abre su estructura molecular, haciendo disponibles sus enlaces peptídicos a otras enzimas. A su vez, Aufrère (1982) comprueba que la supresión de la pepsina disminuye significativamente (en 7 puntos porcentuales) los valores de digestibilidad *in vitro* obtenidos con un método a base de pepsina/celulasa, desarrollado para valorar forrajes de rumiantes.

Se pueden citar, en primer lugar, los métodos que utilizan fluido de yeyuno de cerdo en el segundo paso, como el descrito por Furuya *et al.* (1979), para esta especie. Al analizar con este método 7 piensos (estándar y comerciales), cuyo contenido en FB oscila entre un 1,7 y un 5,5%, se obtienen valores de digestibilidad *in vitro* de la MS menores que los obtenidos *in vivo*, salvo en las dietas con bajo contenido en fibra, en cuyo caso los valores son equivalentes. Esto no es de extrañar, considerando que el citado método sólo simula la digestión hasta el íleon terminal, sin tener en cuenta la digestión de la fibra en el intestino grueso, y sugiere la necesidad de incluir hidrocarbonasas si se pretende valorar dietas con un contenido en fibra

mayor del 4%. Una conclusión similar se deduce de los trabajos de Löwgren *et al.* (1989) y Graham *et al.* (1989). Estos autores intentan simular la digestión ileal mediante una única incubación con fluido duodenal durante 12 h (método de un paso), sin hacer una predigestión con pepsina/HCl. Sus resultados indican que la digestión del almidón y de la proteína se reproduce bien con fluido duodenal, siendo pues suficientes las enzimas pancreáticas para digerir estos nutrientes. Sin embargo, para digerir fibra comprueban que el fluido duodenal no es suficiente, y al incubar las muestras con otros dos inóculos: fluido ileal o extracto de heces, que contienen enzimas microbianas, consiguen una mayor desaparición *in vitro* de la fibra. Como además los valores de desaparición *in vitro* de la MS y EB son mayores con fluido ileal o extracto de heces que con fluido duodenal, globalmente también queda patente la necesidad de enzimas microbianas para digerir la fibra.

Aunque no son trabajos de predicción, Furuya *et al.* (1979) presentan una ecuación de regresión entre la digestibilidad de la MS fecal y la digestibilidad *in vitro* de la MS, con una alta correlación ($R^2=0,96$) y buena precisión ($\text{drs}=1,1$). Graham *et al.* (1989) obtienen también una correlación bastante buena entre la digestibilidad ileal de la MS y de la EB y la desaparición *in vitro* de la MS con fluido duodenal en 5 piensos ($R^2=0,79$ y $0,77$ ($p<0,05$), respectivamente). Sin embargo no encuentran correlación entre la digestibilidad ileal de la fibra y la desaparición *in vitro* de la fibra con fluido duodenal, pero sí entre la digestibilidad fecal de la fibra y la desaparición *in vitro* de la fibra con fluido ileal o extracto de heces ($R^2=0,88$ ($p<0,05$), en ambos casos).

En aves, Clunies y Leeson (1984), basándose en el método de Furuya *et al.*, estudian la influencia de distintos factores sobre la digestibilidad *in vitro*. Con 4 piensos (de contenido en FB menor del 8%), obtienen valores de digestibilidad *in vitro* similares a los de digestibilidad *in vivo* ileal. Además obtienen una buena estimación de la dMS fecal ($R^2=0,96$, $\text{drs}=1,06$). Una correlación similar obtenían previamente Sakamoto *et al.* (1980), también con 4 piensos ($R^2=0,96$). A partir de estos resultados se puede concluir que el fluido yeyunal porcino simula bien la digestión ileal de las

aves. Este método parece aplicable, por tanto, a especies tan distintas como cerdos y aves.

Pero los métodos con fluidos intestinales requieren animales donantes, lo que constituye su principal inconveniente, y dichos fluidos no están bien definidos ni estandarizados. Por ello se planteó la necesidad de sustituirlos por enzimas equivalentes más fáciles de conseguir. Algunos autores (Dierick *et al.*, 1985; Vervaeke *et al.*, 1989) comprobaron experimentalmente que los fluidos intestinales podían ser reemplazados por una solución de pancreatina comercial apropiada, sin reducir la precisión de las predicciones. Esta sustitución contribuye, además, a que las técnicas sean más reproducibles entre laboratorios. Así, en la bibliografía consultada, se encuentran diversos trabajos que utilizan este preparado comercial en el segundo paso. En general, dichos trabajos se plantean obtener valores de digestibilidad *in vitro* para predecir la digestibilidad ileal de la PB, del N y de aminoácidos, por lo que se discutirán en el apartado II.2.4.6. No obstante, algunos autores presentan también correlaciones para la MS y para la MO. Así, Vervaeke *et al.* (1989), con un método a base de pepsina/pancreatina, obtienen una buena correlación ($R^2=0,81$) entre la digestibilidad *in vitro* de la MS y la digestibilidad *in vivo* ileal de la MO, con 8 dietas experimentales de contenido en fibra creciente, aportada siempre por iguales cantidades de alfalfa, salvado de trigo y pulpa de remolacha.

También Boisen y Fernández (1991a y b) con su método de pepsina/pancreatina obtienen valores de digestibilidad *in vitro* de la MS y de la MO. Las condiciones de incubación de esta técnica han sido modificadas a partir de las de Asp *et al.* (1983). En general los valores *in vitro* no difieren significativamente de sus correspondientes valores *in vivo*, aunque son mayores en el caso de los concentrados proteicos (torta de soja, de colza y de girasol y concentrado de hierba) y menores en el caso de los cereales (cebada, trigo, avena). Un caso particular es el centeno, cuya dMS ileal es altamente sobreestimada por el método *in vitro* (Boisen y Fernández, 1991a). Las principales ecuaciones obtenidas en estos dos trabajos se presentan en la **Tabla 5**. Como se puede apreciar, se obtiene una alta correlación

entre la digestibilidad ileal de la MS y de la energía y los valores *in vitro*, para 7 de las 8 materias primas estudiadas (se excluye el centeno) ($R^2=0,94$, $drs=1,5$). Cuando se utilizan piensos de composición muy variable y en número mayor ($n=52$) empeora notablemente la predicción (disminuye el R^2 a 0,58 y aumenta el drs a 3,5), si bien el rango de predicción es mucho mayor.

Tabla 5. Ecuaciones de regresión entre digestibilidad *in vivo* ileal/fecal de MS y energía (en cerdos y aves) y digestibilidad *in vitro* con técnicas multi-enzimáticas de digestión pre-cecal.

n	alimento*	Ecuación†	R^2	drs^\ddagger	Referencia
7	MP	$dMS_i = -32,5 + 1,47 vMS$	0,94	1,5	Boisen y Fernández (1991a)
7	MP	$dE_i = -6,5 + 1,11 vMS$	0,94	1,5	Boisen y Fernández (1991a)
52	P	$dE_i = 1,9 + 0,83 vMO$	0,58	3,5	Boisen y Fernández (1991b)
71	P	$EMA = 0,88 vED$	0,71	0,15	Valdés y Leeson (1992)

* P, piensos ; MP, materias primas.

† dMS_i , digestibilidad *in vivo* ileal de la materia seca; dE_i , digestibilidad *in vivo* ileal de la energía bruta; EMA, energía metabolizable aparente; vMS , digestibilidad *in vitro* de la materia seca ; vMO , digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica; vED , energía digestible *in vitro*.

‡ desviación residual estándar.

En aves, Valdés y Leeson (1992), utilizando también pancreatina comercial, estiman la energía metabolizable aparente (EMA) a partir de la energía digestible *in vitro*. Analizan 71 dietas para aves formuladas a partir de una gran variedad de ingredientes proteicos y energéticos. Como contienen entre un 1 y un 6% de grasa añadida, añaden sales biliares a la pancreatina para facilitar su emulsión. Los valores *in vitro* que obtienen son siempre mayores que los valores *in vivo*, y la correlación entre ambos es bastante buena ($R^2=0,71$), como se puede apreciar en la **Tabla 5**. A partir de este trabajo, y también de los de Clunies y Leeson (1984) y Sakamoto *et al.* (1980), ya citados, se puede concluir que los métodos *in vitro* de digestión pre-cecal

(bien con fluidos intestinales o con pancreatina) estiman bien la digestibilidad total y la EMA en aves, ya que en éstas la fermentación en el intestino grueso tiene poca importancia, pudiéndose considerar la ecuación obtenida aceptable para la predicción. Los mismos autores prueban el método sobre materias primas. Los resultados que obtienen indican que la EMA de los concentrados proteicos unas veces se estima bien (soja extrusionada, soja tostada), y otras se sobreestima ligeramente (torta de soja, gluten de maíz) y que los cereales, en general, se subestiman por el método (excepto la cebada, que se sobreestima).

II.2.4.5. Métodos *in vitro* de digestibilidad de la MS y MO, con utilización de enzimas endógenas del animal y microorganismos o sus enzimas (hidrocarbonasas microbianas).

Ecuaciones de predicción de la digestibilidad fecal de la MS, MO y EB, para cerdos.

Los métodos multi-enzimáticos de digestibilidad *in vitro* en los que se utilizan enzimas microbianas además de las enzimas endógenas propias del animal, son métodos que persiguen el objetivo de reproducir la digestión a lo largo de todo el tracto digestivo, y a veces también de predecir la digestibilidad de la MS, de la MO y de la EB de las dietas y materias primas destinadas a la alimentación porcina, a nivel total o fecal.

Constan de una, dos o tres incubaciones sucesivas de las muestras con distintos preparados enzimáticos, y el posterior análisis del residuo indigestible recogido por filtración (**Cuadro 1**).

Se puede decir, en general, que la mayoría de estos métodos no reproducen exactamente la digestión del animal, es decir que no consiguen una buena simulación, pues los valores de digestibilidad *in vitro* no son iguales que los valores de digestibilidad *in vivo*. En efecto, la digestibilidad *in vitro* en general sobreestima la digestibilidad total *in vivo* de MS y de energía. Esto puede deberse a dos causas fundamentales: en primer lugar, a las pérdidas de partículas de pequeño tamaño y de

material soluble que se producen al filtrar (solubilización de minerales); y en segundo lugar, a la presencia de material endógeno y microbiano en las heces, que no existe en el residuo de la digestión *in vitro*. La digestión *in vitro* es, pues, una medida de la digestión potencial más que de la digestión que realmente tiene lugar en el cerdo.

Un método de una sola incubación es el desarrollado por Löwgren *et al.* (1989) y por Graham *et al.* (1989), ya citados. Estos autores someten 5 piensos de cerdos a un ataque con fluido ileal o extracto de heces y obtienen valores de desaparición *in vitro* de los principales componentes de la dieta (materia seca, energía bruta, proteína bruta, almidón, fibra dietética y polisacáridos no amiláceos). Ambos inóculos presentan enzimas del intestino delgado endógenas del animal y además microorganismos, tal y como demuestran varios autores (Sambrook, 1979; Zoipoulus *et al.*, 1983; Drochner, 1984; Millard y Chesson, 1984). Además se les permite actuar sobre las muestras durante 48 h. Imitan, por tanto, la digestión a nivel de todo el tracto digestivo. Para todos los nutrientes se obtienen siempre valores de desaparición *in vitro* mayores que los de digestibilidad *in vivo* total. Por otra parte, los valores son similares con fluido ileal y con extracto de heces para todos los principios nutritivos, incluida la fibra, lo que indica que ambos inóculos presentan similar actividad enzimática y microbiana. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ehle *et al.* (1982), que también obtienen valores de digestibilidad *in vitro* de la fibra similares al utilizar fluido ileal o heces.

Aunque es un trabajo de metodología y no de predicción, Graham *et al.* (1989) obtienen una correlación aceptable entre la digestibilidad *in vivo* fecal de la MS y de la EB y la desaparición de MS *in vitro* con fluido ileal o extracto de heces ($R^2=0,71$, $R^2=0,66$ y $R^2=0,72$, $R^2=0,66$ ($p<0,01$), respectivamente).

Un método de dos incubaciones es el desarrollado por Xia y Hall (1987). Estos autores utilizan el mismo método que Furuya *et al.* (1979) sustituyendo el fluido de yeyuno por fluido ileal. Con 33 materias primas (cereales, concentrados proteicos salvados y otras fuentes fibro-proteicas) obtienen buena correlación ($R^2=0,83$) entre la digestibilidad *in vivo* total y la digestibilidad *in vitro* de la MO (Tabla 6). Los valores

obtenidos para concentrados proteicos y fuentes fibro-proteicas son prácticamente iguales que sus correspondientes valores de digestibilidad *in vivo*, aunque a veces se sobreestiman (entre 3 y 7 puntos porcentuales). La digestibilidad de los cereales y tapioca y de los salvados, sin embargo, se subestima siempre (entre 4 y 14 puntos porcentuales, con una media de 7,5 puntos) lo que sugiere la necesidad de utilizar amilasa, para alimentos ricos en almidón como los cereales. Estos resultados están de acuerdo con los de Lee *et al.* (1985), según los cuales la amilasa pancreática es insuficiente para digerir el almidón *in vitro*. A pesar de la buena correlación obtenida, los autores creen necesario hacer algunas modificaciones antes de considerar este método como válido para la predicción.

En los métodos de tres pasos, los dos primeros son similares en todas las técnicas revisadas, incluyendo un primer ataque con pepsina/HCl y un segundo con pancreatina para simular la digestión hasta el íleon. El tercer paso pretende evaluar el valor energético potencial de la fibra susceptible de ser degradada por las enzimas microbianas y varía según el trabajo consultado.

Vervaeke *et al.* (1989), teniendo en cuenta que la población bacteriana del intestino grueso del cerdo puede presentar similitud con la del rumen (según apuntan Fonty y Gouet, 1989), adoptan el método desarrollado por Tilley y Terry (1963) para rumiantes, utilizando fluido ruminal como inóculo en el tercer paso. Los resultados que obtienen, con 8 dietas experimentales de contenido en fibra creciente demuestran que tras una preincubación con pepsina y pancreatina, la fermentación de la MO en el intestino grueso se puede estimar con considerable precisión tras la incubación con fluido ruminal. Llegan a esta conclusión al obtener valores de digestibilidad *in vitro* de la MO en el intestino grueso (por diferencia entre los valores obtenidos con Pepsina + Pancreatina + Fluido Ruminal y los obtenidos con sólo Pepsina + Pancreatina) similares a los de digestibilidad *in vivo* en el intestino grueso (obtenidos por diferencia entre los valores de digestibilidad total e ileal). Además, los valores de digestibilidad *in vitro* de la MO con 3 pasos les salen siempre mayores (un 30% en media) que los obtenidos sólo con pepsina-pancreatina. Estos resultados ponen de manifiesto, una

vez más, la importancia que tiene la inclusión de enzimas microbianas para simular la digestión de la fibra en el intestino grueso del cerdo.

Trabajos más recientes sustituyen el fluido ruminal por enzimas o complejos enzimáticos comerciales, pues diversos trabajos en rumiantes han demostrado que la fermentación microbiana se puede simular con enzimas microbianas (Aufrère y Michalet-Doreau, 1988).

Metz y Van der Meer (1985) describen un método *in vitro* para predecir la digestibilidad fecal de la MO utilizando celulasa en el tercer paso, tras dos incubaciones sucesivas con pepsina y pancreatina suplementada con lipasa, sales biliares y amiloglucosidasa. Las ecuaciones de predicción que obtienen con 16 piensos y con un conjunto de 34 materias primas y piensos, de los que no se describen sus ingredientes ni su composición química, figuran en la **Tabla 6**. En un trabajo posterior, Van der Meer y Pérez (1992), valoran las mismas 16 dietas sin añadir nada a la pancreatina. Las razones que les inducen a añadir o no otros reactivos no están explicadas en estos trabajos, quedando esta cuestión aún por dilucidar. En cualquier caso, obtienen una mejor estimación de la dMO cuando no añaden nada ($R^2=0,85$, $drs=2,01$ vs. $R^2=0,72$, $drs=2,7$).

El método descrito por Van der Meer y Pérez (1992), a base de pepsina, pancreatina (sin añadir nada) y celulasa, se plantea, igual que el anterior, el objetivo de predecir la digestibilidad fecal de la MO. Es un trabajo que valora *in vitro* 89 piensos para cerdos valorados *in vivo* en 4 países europeos (Francia, $n=43$; Holanda, $n=16$; Alemania, $n=18$ y Suiza, $n=12$). Las muestras, junto con sus valores de digestibilidad *in vivo* de la MO y su composición química, proceden de los distintos laboratorios y los análisis de digestión *in vitro* se llevan a cabo siempre en el laboratorio holandés. Son piensos elaborados a partir de una base de cereales a la que se añaden cantidades diferentes de subproductos fibrosos y presentan un contenido de extracto etéreo entre un 1 y un 10%, con un 5% de media. Es un método de predicción pues obtiene buena correlación entre las digestibilidades *in vivo* e *in vitro* de la MO ($R^2=0,85$; $drs=2$), como puede apreciarse en la **Tabla 6**. La inclusión del InFB como variable en un análisis de

regresión múltiple mejora la predicción ($R^2=0,90$; $drs=1,7$). Los autores indican que, teniendo en cuenta la baja reproducibilidad del análisis de FB (obtenida en el Ring Test de Van der Meer, 1984), cabe pensar que si la FB de las 89 dietas se hubiera analizado en el mismo laboratorio, la predicción de la ecuación hubiera mejorado más. Por otra parte, se comprueba que si se elimina la incubación con celulasa, la precisión de la ecuación empeora aumentando la desviación residual estándar (de 2,5 a 3,5), en 26 materias primas estudiadas (Van der Meer, citado por Van der Meer y Pérez, 1992), sugiriendo la importancia del tercer paso de la técnica, aunque la simulación lograda no sea perfecta.

Tabla 6. Ecuaciones de regresión entre digestibilidad *in vivo* fecal de MS, MO y energía (en cerdos) y digestibilidad *in vitro* con técnicas multi-enzimáticas de digestión total.

n	alimento*	Ecuación†	R^2	drs^\ddagger	Referencia
34	MP+P	$dMO = -1,8 + 0,99 vMO$	0,83	3,8	Metz y Van der Meer (1985)
16	P	$dMO = -1,0 + 0,98 vMO$	0,72	2,7	Metz y Van der Meer (1985)
33	MP	$dMO = 1,05 vMO$	0,83	-	Xia y Hall (1987)
7	MP	$dMS = -4,6 + 1,02 vMS$	0,94	1,9	Boisen y Fernández (1991a)
7	MP	$dE = -8,1 + 1,07 vMS$	0,92	2,5	Boisen y Fernández (1991a)
51	MP	$dE = -19,1 + 1,16 vMO$	0,96	3,2	Boisen y Fernández (1991b)
52	P	$dE = -24,9 + 1,23 vMO$	0,85	2,2	Boisen y Fernández (1991b)
89	P	$dMO = 12,5 + 0,80 vMO$	0,85	2,0	Van der Meer y Pérez (1992)

* P, piensos ; MP, materias primas.

† dMS, digestibilidad *in vivo* fecal de la materia seca ; dMO, digestibilidad *in vivo* fecal de la materia orgánica ; dE, digestibilidad *in vivo* fecal de la energía bruta; vMS, digestibilidad *in vitro* de la materia seca ; vMO, digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica.

‡ desviación residual estándar.

Boisen y Fernández (1991a y b) desarrollan un método para predecir la digestibilidad fecal de la materia seca y de la energía incorporando a las dos incubaciones descritas (pepsina y pancreatina) una tercera con un preparado enzimático fúngico: Viscozyme. Este preparado se produce a partir de una cepa seleccionada de *Aspergillus* y es un complejo multi-enzimático que contiene un amplio conjunto de hidrocarbonasas (celulasa, hemicelulasa, arabinasa, xylanasa, β -glucanasa y pectinasa). En la **Tabla 6** se recopilan las ecuaciones de regresión obtenidas. En el trabajo de Boisen y Fernández (1991b), si se compara la ecuación obtenida con piensos (52 piensos de composición muy variable) con la obtenida con materias primas de origen vegetal (51 muestras de las materias primas más comúnmente utilizadas en Dinamarca: cebada, maíz, trigo, avena, centeno, salvado de trigo, mandioca, torta de maíz, de soja, de girasol, de coco y de colza, guisantes, concentrado de hierba, harina de pescado, de carne y de huesos, leche desnatada en polvo y suero en polvo), en ambos casos se obtienen correlaciones altas, aunque en el caso de las materias primas se obtiene mejor coeficiente de determinación ($R^2=0,96$) que en los piensos ($R^2=0,85$). Esto se debe, según los autores, al menor rango de digestibilidad que presentan los piensos, en comparación con un rango más amplio, tanto de digestibilidad como de composición química, de las materias primas. En todo caso, la conclusión que se puede sacar de este trabajo es que el método de digestibilidad *in vitro* que proponen estos autores se puede utilizar para estimar el valor energético tanto de piensos como de materias primas. Además, el método resultó ser muy reproducible en un Ring Test en el que participaron 9 laboratorios daneses, por lo que desde 1993 se considera un método oficial de valoración energética de los piensos comerciales elaborados en este país (Boisen y Fernández, 1993). Por otra parte, utilizando sólo 7 materias primas (Boisen y Fernández, 1991a), también se obtienen altas correlaciones ($R^2=0,94$ y $R^2=0,92$), aunque en este caso el escaso número de datos puede haber favorecido las correlaciones obtenidas.

En general, considerando la **Tabla 6** globalmente, se puede apreciar que los valores de digestibilidad *in vitro* de la MO están muy correlacionados con la

digestibilidad *in vivo* fecal de la MO y de la energía (presentando coeficientes de determinación, R^2 , entre 0,72 y 0,96, y drs siempre inferiores a 3,8), para una gran variedad de piensos y materias primas.

II.2.4.6. Métodos *in vitro* de digestibilidad de la proteína, nitrógeno y aminoácidos, con enzimas endógenas de estómago e intestino delgado.

Ecuaciones de predicción de la digestibilidad ileal y fecal de la PB, PD, N y aminoácidos, para cerdos.

Como ya se ha dicho en apartados anteriores, la investigación en ganado porcino se ha encaminado fundamentalmente hacia el desarrollo de técnicas *in vitro* que tratan de imitar la digestión pre-cecal del nitrógeno (N) y aminoácidos, sobre todo de materias primas. Para ello se han utilizado técnicas multi-enzimáticas de una única incubación o de dos incubaciones sucesivas bien con preparados enzimáticos comerciales o con fluidos intestinales. Algunas de ellas se han planteado, además, el objetivo de predecir la digestibilidad ileal o fecal de estos nutrientes.

En conjunto, con todas las técnicas de digestión *in vitro* desarrolladas para cerdos, se obtienen valores de digestibilidad de los componentes nitrogenados mayores que sus equivalentes valores *in vivo*, obtenidos tanto a nivel ileal como fecal. Esto, además, es así ya se utilicen fluidos intestinales o enzimas comerciales, en la técnica. La magnitud de esta diferencia varía según el trabajo consultado. Cuando se comparan los valores de digestibilidad *in vitro* con los de digestibilidad *in vivo* ileal, se encuentran diferencias medias de 13 (Dierick *et al.* 1985) o de unos 20 puntos porcentuales (Graham *et al.*, 1989; Boisen y Fernández, 1991a y 1995; Cone y Van der Poel, 1993). Si se compara con la digestibilidad *in vivo* fecal, las diferencias que se obtienen son de alrededor de 4 puntos (Furuya *et al.*, 1979; Dierick *et al.* 1985), o de unos 14 puntos (Graham *et al.*, 1989; Boisen y Fernández, 1991a). Los valores de proteína digestible (PD) *in vitro* obtenidos por Babinszky *et al.* (1990) son siempre mayores que los de PD fecal *in vivo*, si bien esta diferencia es sólo de 1,35 puntos

porcentuales, en media. Una posible explicación a ésto es la presencia de material endógeno y microbiano en la digesta ileal y en las heces del animal, que supone un aumento de la cantidad de proteína presente en ellas, y se traduce en una menor digestibilidad aparente *in vivo* de la proteína. El residuo *in vitro* está, sin embargo, libre de contaminación endógena o microbiana, por lo que todo el N presente en el mismo procede del alimento. *In vitro*, además, todo el N que se solubiliza se contabiliza como N digerido, mientras que *in vivo* hay N que se solubiliza pero que no se absorbe, contabilizándose como N no digerido. La digestibilidad *in vitro* es, por tanto, una medida de la digestibilidad potencial o real.

Muchos de los trabajos que ya se han comentado en el apartado II.2.4.4 se realizaron, en principio, para valorar *in vitro* la digestibilidad ileal de la proteína o del N y de determinados aminoácidos. De todos ellos se puede concluir que, en general se obtienen correlaciones peores para los componentes nitrogenados que para la MS. Además, en general, muchos de ellos están basados en un número de datos muy escaso, ya que son de metodología, por lo que las ecuaciones que dan no son válidas para la predicción.

Entre los que utilizan fluidos intestinales, los de Löwgren *et al.* (1989) y de Graham *et al.* (1989), ya han sido citados en apartados anteriores. Estos autores obtienen valores de desaparición *in vitro* de la PB mayores con fluido duodenal que con fluido ileal o heces, y mayores también con fluido ileal que con extracto de heces. Esto puede deberse, en parte, a que una cantidad de la PB presente en el residuo de la digestión con fluido ileal o heces es de origen microbiano y se está contabilizando, sin embargo, como proteína alimentaria no digerida. Esta circunstancia no se da al inocular con fluido duodenal, ya que éste no contiene microorganismos. Al correlacionar la digestibilidad *in vivo* ileal de la PB con la desaparición *in vitro* de la PB con fluido duodenal obtienen un coeficiente de determinación, $R^2=0,77$ ($p<0,05$), con 5 muestras. Sin embargo, si el inóculo es fluido ileal o extracto de heces no hay correlación con la digestibilidad *in vivo* fecal de la PB. Una explicación puede ser, según los autores, la mayor variabilidad de los valores de digestibilidad *in vivo* ileal

comparados con los de digestibilidad total; y otra, la mayor cantidad de N endógeno en la digesta ileal con respecto a las heces, que daría valores más variables de digestibilidad ileal.

Furuya *et al.* (1979), con su método de dos pasos (pepsina y fluido de yeyuno porcino), correlacionan la digestibilidad *in vitro* de la PB con la digestibilidad *in vivo* fecal de la PB, y obtienen una alta correlación ($R^2=0,96$; $drs=1,2$; $p<0,01$), con 7 piensos comerciales.

En aves, Clunies y Leeson (1984), con 4 piensos y basándose en la técnica de Furuya *et al.* (1979), estiman la digestibilidad *in vivo* fecal de la PB con peor correlación y precisión ($R^2=0,77$, $drs=1,65$), mientras que Sakamoto *et al.* (1980), también con 4 piensos, obtienen una correlación muy alta ($R^2=0,98$).

Los métodos desarrollados para el cerdo, utilizando pancreatina, están recopilados en la **Tabla 7**. Babinszky *et al.* (1990), investigan 7 materias primas y 16 piensos para cerdos. Los piensos se componen en más de un 50% por subproductos de cereales y mandioca y el resto por subproductos oleaginosos. Presentan un contenido en EE entre un 1,4 y un 9,5% (media de $7,1 \pm 7,1\%$) y el de las materias primas se encuentra también dentro de este rango (salvo en el caso de la semilla de colza, que tiene un 38%). La correlación de PD *in vitro* con la PD *in vivo* fecal mejora ostensiblemente si se hace una extracción previa de los lípidos con un solvente en lugar de añadir lipasa y sales biliares a la pancreatina ($R^2=0,90$, $drs=6,2$ g/KgMS vs. $R^2=0,64$, $drs=10$) para los 16 piensos estudiados. La pancreatina es, pues, insuficiente, cuando las muestras tienen un contenido en EE elevado, siendo necesario facilitar la hidrólisis de la grasa mediante tratamientos complementarios. Los mismos autores también consideran necesario añadir amilasa, por el alto contenido de almidón que tienen los piensos, aportado por los subproductos de cereales y mandioca (el contenido en FB de los piensos es de 3 a 11% (media $7 \pm 2\%$), y el de las materias primas de 5 a 16% (media $9 \pm 4\%$)). En la **Tabla 7** se muestran las ecuaciones de regresión obtenidas para piensos y materias primas sometidas a una pre-extracción de la grasa. En ambos casos la correlación encontrada es alta, y lo es más en el caso de

las materias primas debido al amplio rango de PB que presentan (de 4 a 47%), siendo menor el de los piensos (de 17 a 22%). Sin embargo, la desviación residual estándar de la ecuación obtenida con las materias primas es muy elevada (17,4), lo que indica una gran imprecisión de la predicción.

Tabla 7. Ecuaciones de regresión entre PD y digestibilidad *in vivo* ileal/ fecal de PB y N (en cerdos) y digestibilidad *in vitro* con técnicas multi-enzimáticas de digestión pre-cecal.

n	alimento*	Ecuación [†]	R ²	drs [‡]	Referencia
30	P+MP	$dN_f = 7,26 + 0,85 vN$	0,76	6,7	Dierick <i>et al.</i> (1985)
30	P+MP	$dN_i = 24,75 + 0,57 vN$	0,31	6,7	Dierick <i>et al.</i> (1985)
7	MP	$PD_f = -12,2 + 0,97 vPD$	0,98	17,4	Babinszky <i>et al.</i> (1990)
16	P	$PD_f = -29,1 + 1,11 vPD$	0,90	6,2	Babinszky <i>et al.</i> (1990)
52	P	$dN_i = 29,9 + 0,60 vNc$	0,46	3,2	Boisen y Fernández (1991b)
52	P	$dN_f = -7,4 + 1,09 vNc$	0,72	2,7	Boisen y Fernández (1991b)
61	MP	$dN_f = 0,7 + 0,97 vNc$	0,86	6,3	Boisen y Fernández (1991b)
48	P	$dN_i = 23,8 + 0,67 vNc$	0,56	2,9	Boisen y Fernández (1995)
15	MP	$dN_i = -3,1 + 1,04 vNc$	0,92	3,5	Boisen y Fernández (1995)

* P, piensos ; MP, materias primas.

[†] dPB_f , digestibilidad *in vivo* fecal de la PB (%); dN_f , digestibilidad *in vivo* fecal del nitrógeno (%); dN_i , digestibilidad *in vivo* ileal del nitrógeno (%); PD_f proteína digestible *in vivo* fecal (g/Kg MS); vPB , digestibilidad de la PB *in vitro* (%); vN , digestibilidad del nitrógeno *in vitro* (%); vPD , proteína digestible *in vitro* (g/Kg MS); vNc , digestibilidad del nitrógeno *in vitro* corregido según pérdidas endógenas (%).

[‡] desviación residual estándar.

Según el método de Boisen y Fernández (1991b) los valores de digestibilidad *in vitro* del N (vN) y de los aminoácidos son mucho menos variables que sus correspondientes valores de digestibilidad aparente *in vivo* (dN), en los 52 piensos y las 61 materias primas estudiadas (51 de origen vegetal y 10 de origen animal) y

siempre mayores, como ya habíamos comentado. Los mismos autores, en otros trabajos (Boisen y Fernández, 1991a y 1995), observan lo mismo con 7 y con 15 materias primas (cereales y concentrados proteicos), respectivamente. Además, en ninguno de estos estudios se encuentra correlación entre vN y dN ileal (ni tampoco con la dN fecal), lo que se atribuye al N endógeno. Similares resultados obtienen Cone y Van der Poel (1993), basándose en el método de Babinszky *et al.* (1990), pues obtienen una correlación muy pobre ($R^2=0,23$) entre los valores de digestibilidad del N *in vivo* e *in vitro*, de 48 piensos concentrados. Además, estos autores también lo atribuyen al N endógeno. Se considera, por tanto, que sólo se puede comparar la digestibilidad *in vitro* del N con la digestibilidad aparente tanto a nivel ileal como fecal, después de hacer una corrección de los valores de vN según las pérdidas de N endógeno.

La mencionada corrección se hace de la siguiente manera: se calculan las pérdidas de N endógeno por diferencia entre los valores de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* del N a nivel ileal. Estas pérdidas a veces están correlacionadas con la MS del residuo (MS indigestible), en cuyo caso los valores de vN se corrigen en función de ésta; cuando no se da esta correlación, se utiliza un valor medio de N endógeno para corregir los valores de vN. Posteriormente se obtienen las ecuaciones de predicción de la dN aparente ileal mediante correlación con los valores de vN corregidos (vNc). Estas ecuaciones figuran en la **Tabla 7**. Por otro lado, también se obtienen las ecuaciones de predicción de la dN fecal según valores de digestibilidad *in vitro* ileal del N corregidas por las pérdidas de N endógeno (**Tabla 7**). Del trabajo de Boisen y Fernández (1991b) se puede concluir que la técnica *in vitro* propuesta, corregida según las pérdidas de N endógeno, es capaz de predecir mejor la dN fecal que la dN ileal en las 52 dietas estudiadas, ($R^2=0,72$, $drs=2,7$ y $R^2=0,46$, $drs=3,2$, respectivamente). Esto se debe, según los autores, a que sus valores de dN ileal son mucho menos variables que los de dN fecal. Estos resultados coinciden con los que obtienen Dierick *et al.* (1985), al valorar mediante su método *in vitro* de pepsina/pancreatina un conjunto de 30 alimentos (6 piensos, no descritos en el trabajo,

y 24 materias primas, entre las que abundan los cereales y los concentrados proteicos), ya que obtienen una mejor estimación de la dN fecal que ileal ($R^2=0,76$ vs. $R^2=0,31$); si bien, las ecuaciones que obtienen estos últimos incluyen como variable independiente la digestibilidad *in vitro* del N sin hacer ninguna corrección por las pérdidas de N endógeno (**Tabla 7**).

En trabajos posteriores de los mismos autores se obtienen también estimaciones de la dN aparente ileal según los valores *in vitro* corregidos por el N endógeno. Así, Boisen y Fernández (1993) obtienen una correlación de $R^2=0,55$ y $drs=2,9$ para 33 dietas (no descritas en el trabajo), y de $R^2=0,96$ y $drs=3,6$, para 10 materias primas (cereales, tortas de soja, de girasol, de colza y concentrado de hierba); y Boisen y Fernández (1995) obtienen una correlación muy alta ($R^2=0,92$, $drs=3,5$), en 15 materias primas y peor en 48 piensos ($R^2=0,56$, $drs=2,9$), según se puede apreciar en la **Tabla 7**. De estos resultados se puede concluir que, en piensos, las estimaciones de la dN ileal resultan, una vez más, peores que la estimación de la dN fecal obtenida en el trabajo anterior ($R^2=0,55$ ó $0,56$ vs. $R^2=0,72$).

Cuando se valoran materias primas, la predicción de la dN fecal con 61 datos es buena y mejor que cuando se utilizan 52 piensos ($R^2=0,86$ vs. $0,72$), lo cual puede deberse, según los autores (Boisen y Fernández, 1991b), al mayor rango de digestibilidad y de composición química existente en el conjunto de materias primas frente al que tienen los piensos. Si se utiliza un menor número de datos (Boisen y Fernández, 1993 y 1995) aumentan enormemente las correlaciones obtenidas entre dN ileal y vNc ($R^2=0,96$ y $R^2=0,92$, para 10 y 15 materias primas, respectivamente).

En cuanto a la digestibilidad *in vitro* de aminoácidos, estos mismos autores han prestado especial atención a los más limitantes en alimentación porcina (Lys, Met, Thr). En general, los aminoácidos se digieren *in vitro* prácticamente igual que el N y las pérdidas endógenas de cada aminoácido individualmente se calculan igual que para el N. Además estas pérdidas coinciden con el perfil de aminoácidos medido en la proteína endógena por Wünche *et al.* (1987). Por consiguiente, la digestibilidad aparente ileal de los aminoácidos individuales se puede predecir satisfactoriamente

con su digestibilidad *in vitro*, una vez hechas las correcciones por aminoácidos endógenos. Así, con 52 piensos (Boisen y Fernández, 1991b), se obtienen correlaciones mayores que para el N, en el caso de la Lys ($R^2=0,61$, $drs=2,8$) y la Met ($R^2=0,55$, $drs=2,3$) y peor para la Thr ($R^2=0,37$, $drs=3,7$); con 33 piensos (Boisen y Fernández, 1993), las correlaciones son $R^2=0,72$, $0,45$ y $0,52$, para Lys, Met y Thr, respectivamente; y con 48 piensos (Boisen y Fernández, 1995), se obtienen valores de $R^2=0,66$, $0,55$ y $0,53$, para los mismos aminoácidos, respectivamente. En cuanto a los aminoácidos no esenciales, se obtienen siempre correlaciones peores que para la proteína.

II.2.4.7. Métodos de digestibilidad *in vitro* para determinar el valor nutritivo de los alimentos para conejos.

Hasta el momento actual no se dispone de técnicas *in vitro* capaces de reproducir con cierta fiabilidad el proceso digestivo del conejo ni de estimar de forma correcta el valor nutritivo de las dietas y de las materias primas destinadas a la alimentación de esta especie, encontrándose pocos trabajos en la bibliografía sobre digestibilidad *in vitro* en conejos.

Teniendo en cuenta la importancia que tiene la fermentación en el ciego del conejo, algunos trabajos intentan reproducir ésta utilizando métodos *in vitro* de una sóla incubación con distintos fluidos intestinales. En general comparan el fluido cecal del conejo con el fluido ruminal bovino y aprecian siempre una mayor actividad fermentativa de los microorganismos ruminales que de los cecales. En efecto, según Aderibigbe y Cheeke (1993), los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS obtenidos con fluido ruminal ($vMS_{ruminal}$) son mayores ($p<0,05$) que los obtenidos con fluido cecal (vMS_{cecal}). Las 6 dietas utilizadas en este trabajo se incuban en un sistema cerrado anaerobio (mediante gasificación con CO_2) durante 48 h, tiempo considerado suficiente por los autores para obtener una adecuada digestión microbiana cecal y una óptima fermentación ruminal. Varían de un alto contenido en fibra y bajo en hidratos de carbono fermentables o contenidos celulares, CC (30% FAD y 55% CC), al caso

contrario (13% FAD y 71% CC), y su contenido en proteína oscila entre el 15,7 y el 22%. Los valores de vMSruminal son, además, muy semejantes a los valores de digestibilidad *in vivo* (dMS), constituyendo el 99% en media de los valores de dMS, mientras que los de vMScecal representan sólo el 70%. Por otra parte, los valores de vMScecal de los piensos fibrosos representan el 60% de los valores de vMSruminal, mientras que en los piensos con mayor contenido en hidratos de carbono fermentescibles representan el 80%. Estos resultados sugieren que la fermentación en el ciego del conejo es menos eficiente que en el rumen, particularmente para dietas ricas en fibra, enfatizando la escasa capacidad que tiene el conejo para digerir la fibra. Por otro lado, tanto la vMScecal como la vMSruminal muestran fuerte correlación negativa con la FAD ($R^2=0,90$) y positiva con los CC ($R^2=0,86$).

Schoftyssek y Seim (1988) obtienen resultados similares. Incubando durante 24 h, con líquido cecal de conejo o con líquido ruminal, 8 piensos comerciales para conejos (FB=9,6-18,7; PB=12,8-22,4), cuantifican la cantidad de gas producido (GP, ml) por las bacterias cecales o ruminales en su actividad fermentativa. Los valores (ml de GP) obtenidos *in vitro* con líquido ruminal resultan siempre mayores que los obtenidos con líquido cecal.

Los resultados de estos dos trabajos están de acuerdo con lo apuntado por Makkar y Singh (1987), que observan una mayor actividad celulolítica en el contenido ruminal que en el cecal.

La utilidad del líquido ruminal para simular la fermentación cecal del conejo ha sido también demostrada en trabajos de degradabilidad ruminal *in situ*. En este sentido, Escalona *et al.* (1995), utilizando el método de las bolsas de nylon, obtienen valores de degradabilidad ruminal de la FND de 6 tipos de fibra, para distintos tiempos de incubación en el rumen de corderos. Los valores de desaparición obtenidos tras 8 h de incubación se correlacionan bien con la digestibilidad total de la FND en conejos obtenida por García *et al.* (1995).

Al relacionar los valores *in vitro* con los de digestibilidad *in vivo* de MS, MO y energía, los resultados obtenidos *in vitro* con fluido ruminal se correlacionan mejor que

los obtenidos con contenido cecal, según Aderibigbe y Cheeke (1993), dándose el caso contrario en el trabajo de Scholtyssek y Seim (1988). En todo caso, estas correlaciones se basan en un número muy escaso de datos y sería necesario validarlas con un número de datos mayor. Estos últimos autores, utilizando líquido cecal, estiman la EM (Mj/Kg MS) de las dietas en función del GP con un coeficiente de determinación, $R^2=0,69$ y una desviación residual estándar, $drs=6,65$. Esta estimación, es, sin embargo, peor que la obtenida con la FB ($R^2=0,85$; $drs=4,75$). La ecuación propuesta por los autores es, no obstante, la que incluye los parámetros GP y PB además de la FB, ya que la precisión mejora significativamente:

$$EM \text{ (Mj/Kg MS)} = 17,6 - 0,17 \text{ FB}(\%) - 216 (1/\text{GP}) \text{ (ml)} + 0,13 \text{ PB}(\%)$$

$$R^2=0,92 \quad drs=3,50 \quad n=8$$

De la misma manera, proponen las siguientes ecuaciones para estimar la ED y la dMO:

$$ED \text{ (Mj/Kg MS)} = -5,55 - 0,20 \text{ FB} + 0,84 \text{ GP} - 0,01 \text{ GP}^2 + 0,16 \text{ PB}$$

$$R^2=0,92 \quad drs=3,36 \quad n=8$$

$$dMO(\%) = 85,41 + 0,07 \text{ FB} + 0,04 \text{ GP}^2 - 0,55 \text{ PB} + 2,39 \text{ EE} - 1,23 \text{ ELN}$$

$$R^2=0,88 \quad drs=4,61 \quad n=8$$

La ecuación propuesta para la estimación de la dMO es la que predice con menor precisión a pesar de ser la que más parámetros incluye. No justifica, por tanto, el uso de tantas variables explicativas. Además, la variable ELN es linealmente dependiente de todos los demás parámetros químicos de la dieta, por lo que no es estadísticamente correcta su inclusión en la ecuación.

En todos los casos, la inclusión del gas producido junto con la PB mejora el coeficiente de correlación y reduce el drs además de disminuir las diferencias entre los valores predichos para cada pienso y sus valores obtenidos *in vivo*. La cuantía de esta mejora, sin embargo, no es lo suficientemente importante como para justificar el uso de un parámetro como el GP, cuyos valores son difíciles de obtener, al necesitar animales

donantes de líquido cecal. Además, el número de datos en que se basa este trabajo es muy escaso, por lo que sus conclusiones se deben tomar con precaución.

Otro método de digestión *in vitro* desarrollado para valorar alimentos de conejos es el de Llopis y Fernández Carmona (1992). Estos autores prueban un método de una sóla incubación con contenido cecal, y un método multi-enzimático de tres incubaciones sucesivas con pepsina/HCl, pancreatina y contenido cecal de conejo para valorar 3 materias primas (paja, alfalfa y cebada) y 10 piensos experimentales. También prueban a eliminar la tercera de estas incubaciones con el fin de simular únicamente la digestión pre-cecal. Obtienen diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los valores de digestibilidad *in vitro* de MS y de MO obtenidos con el método de tres pasos y con el de dos pasos, siendo siempre mayores en el primer caso. También son significativamente mayores los valores de digestibilidad *in vitro* con contenido cecal únicamente. Sin embargo los valores obtenidos con contenido cecal no difieren significativamente de los obtenidos mediante las tres incubaciones, lo que confirma la existencia de amilasas y proteasas en el fluido cecal, tal y como apuntan Blas (1986), Makkar y Singh (1987) y Marounek *et al.* (1995).

Por otra parte, no hay correlación entre los valores de digestibilidad *in vivo* y los obtenidos con la técnica de dos pasos, pero sí con los obtenidos según la técnica de un sólo paso con contenido cecal (vMS_1) y con la técnica de tres pasos (vMS_3). Estos resultados indican la necesidad de simular de alguna manera *in vitro* la fermentación cecal del conejo.

En un análisis de regresión simple, se obtienen las siguientes ecuaciones, respectivamente:

$dMS = 14,43 - 0,86 vMS_1$	$R^2 = 0,99$	$drs = 2$	$n = 6$
$dMS = 22,65 - 0,66 vMS_3$	$R^2 = 0,71$	$drs = 6,6$	$n = 13$

El ataque con contenido cecal (vMS_1) resulta, pues, más representativo de la digestibilidad *in vivo*.

En un análisis de regresión múltiple, incluyendo también la variable FB, no se consigue mejorar la estimación según el método de contenido cecal, pero sí según el de tres incubaciones ($R^2=0,99$, $drs=2,66$ y $R^2=0,92$, $drs=3,66$, respectivamente). Similares resultados se obtienen al incluir la FAD ($R^2=0,99$, $drs=2,26$ y $R^2=0,91$, $drs=3,44$, respectivamente). Por consiguiente y teniendo en cuenta que la técnica basada en un sólo ataque con contenido cecal es más rápida y sencilla, los autores la consideran más recomendable, si bien antes es preciso corroborar estos resultados valorando un número de muestras mayor, ya que este trabajo está basado en sólo 6 muestras.

Finalmente, Xiccato *et al.* (1994), basándose en la técnica de referencia desarrollada por Ramos *et al.* (1992) prueban la eficacia de diferentes complejos enzimáticos comerciales (Viscozyme, Bio-Feed Plus o Energex) frente a la ausencia de enzima, en el tercer paso de un método de digestibilidad *in vitro* cuyos primeros dos pasos son un ataque con pepsina y otro con pancreatina. Las 19 dietas utilizadas para la calibración son piensos comerciales cuya composición química se corresponde con los estándares de alimentación de las diferentes categorías de conejos, y experimentales, para aumentar los rangos de composición química y de digestibilidad. En general los valores de vMO están bastante próximos a los de dMO para todos los complejos enzimáticos estudiados y, lógicamente, los valores de vMO obtenidos al no añadir ninguna enzima en el tercer paso son muy inferiores a los de dMO, lo que indica la necesidad de incluir un paso que simule la fermentación cecal.

Con el Viscozyme se obtienen las mejores predicciones de dMO y de ED según la digestibilidad *in vitro* de la MO ($R^2=0,74$; $R^2=0,79$, respectivamente), seguido por el Energex ($R^2=0,71$; $R^2=0,72$, respectivamente) mientras que con el Bio-Feed Plus o sin enzima, se obtienen predicciones peores e iguales ($R^2=0,55$ y $0,59$), comparables a las obtenidas según parámetros químicos como FB o FND.

Se puede pensar, por tanto, en la posible ventaja de un método multi-enzimático de digestión *in vitro* frente a un método químico para estimar el valor nutritivo de

piensos compuestos de conejos. No obstante, antes de poder afirmar que dicho método sea mejor predictor que los parámetros químicos, es necesario demostrar que sea más repetible y reproducible que el análisis de estos parámetros.

En este sentido, otro de los objetivos de este trabajo fue comparar los resultados obtenidos sobre los mismos piensos en dos laboratorios (Madrid y Padua), utilizando la misma técnica *in vitro*, para obtener una medida de la reproducibilidad del método. Los valores que se obtuvieron en ambos laboratorios fueron diferentes y también las pendientes de las dos ecuaciones de regresión ($p < 0,05$), por lo que no fue posible proponer una ecuación de predicción común. La reproducibilidad del método fue, pues, baja en este trabajo. Estos resultados, sin embargo, no son concluyentes, ya que dos laboratorios no son suficientes para obtener un índice de la variabilidad de un análisis. Es necesario, pues, realizar un Ring Test en el que participen un número adecuado de laboratorios (como mínimo tres) antes de poder sacar conclusiones sobre la reproducibilidad de este nuevo método de valoración de alimentos *in vitro*, y establecer la medida en que los valores obtenidos se pueden usar como variables predictoras del valor energético de los alimentos para conejos.

En cuanto a la reproducibilidad de distintos análisis químicos, ya se ha comentado en el apartado II.2.2.2. de esta revisión.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. DIETAS UTILIZADAS.

Para el desarrollo de los dos primeros objetivos de este trabajo experimental se ha utilizado un total de 27 piensos para conejos. De ellos, 10 piensos comerciales han sido suministrados por diversas empresas españolas (Nanta, S.A.; Pascual, S.A.; Coren, S.C.L. y Rosell, S.A.); 12 piensos experimentales han sido ya utilizados para otras investigaciones en el Departamento de Alimentación Animal de la E.T.S.I. Agrónomos de Madrid, donde se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral, y 5 piensos experimentales más, proceden del Departamento de Ciencia Animal de la E.T.S.I. Agrónomos de Valencia. Los valores de digestibilidad *in vivo* de todos los piensos se han obtenido mediante las correspondientes pruebas de digestibilidad realizadas en el citado Departamento de Madrid, salvo de los 5 piensos procedentes de Valencia, cuyos datos fueron obtenidos en su lugar de origen.

La **Tabla 8** presenta los valores medios y el rango de variación de la composición química y de los valores de digestibilidad de estos 27 piensos.

El contenido medio de PB de los piensos comerciales es de 17,6%, con un estrecho rango de 3 unidades; el de FB es de 17,4% y el de FAD de 20,8%, con intervalos de variación también estrechos (de unas 5 unidades); el contenido de FND es de 38% con un intervalo de 9 unidades y el de LAD de 5%. Los piensos experimentales se seleccionaron de tal forma que no se desviaran mucho de los rangos de proteína y de fibra normalmente presentes en piensos comerciales para conejos. Así, el contenido en proteína es similar en los piensos experimentales y en los comerciales. Los experimentales, no obstante, contribuyen a aumentar los rangos de fibra del conjunto total de piensos. Así, los rangos de FB, de FAD y de FND del total de 27 piensos son de 7,5, de 8,4 y de 14,3 unidades, respectivamente.

Los valores de dMS y de dEB de los piensos comerciales presentan un rango de variación estrecho (5,9 y 5 unidades, respectivamente). El de los piensos experimentales es, sin embargo, muy amplio (de 17 y 14 unidades, respectivamente) y abarca al anterior. La ED del conjunto varía entre aproximadamente 2.300 y 3.000

Kcal/Kg; la dPB entre 68 y 79% y la dFB entre 0 y 28%. La dPB presenta una desviación estándar relativamente baja (2,56), mientras que la de la dFB es alta (6,47).

Tabla 8. Composición química (% SMS) y digestibilidad (%) de los piensos españoles.

	Piensos comerciales (n=10)				Piensos experimentales (17)			
	mín	m	máx	d.e.	mín	m	máx	d.e.
Cenizas	7,26	8,65	10,62	1,00	6,28	8,84	11,84	1,72
EB(Kcal/Kg)	4144,4	4274,9	4479,1	99,85	4152,3	4299,8	4456	78,40
PB	16,21	17,63	19,35	1,00	15,8	18,28	20	1,16
FB	14,33	17,41	18,72	1,42	12,1	15,88	19,6	2,31
FND	33,15	37,98	42,49	3,20	29,25	37,12	43,51	4,15
FAD	17,85	20,82	22,96	1,63	14,75	18,97	23,17	2,37
LAD	4,32	5,18	6,15	0,51	3,09	4,33	6,53	0,90
dMS	57,38	60,44	63,3	1,89	55,2	63,03	72	3,93
dEB	57,52	60,26	62,5	1,78	55,6	62,49	69,5	3,67
ED(Kcal/Kg)	2466,5	2575,2	2688,4	71,79	2308,7	2688,1	2984,3	180,05
dPB	68,47	72,84	76,13	2,59	69,06	73,68	78,8	2,57
dFB	8,33	17,99	25,64	6,27	0,13	17,44 [†]	27,8	9,90

[†]: n=7

mín: valor mínimo; m: valor medio; máx: valor máximo; d.e.: desviación estándar; EB: energía bruta; PB: proteína bruta; FB: fibra bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente; dMS, dEB, dPB y dFB: digestibilidad de la MS, EB, PB y FB; ED: energía digestible.

El contenido en materias primas es similar en todos los piensos (tanto en los comerciales como en los experimentales), como se puede apreciar en la **Tabla 9**. Los piensos experimentales presentan varios ingredientes más en su composición (mandioca, germen de maíz, granilla de uva, soja integral, cascarilla de avena, subproducto de pimentón, raicilla de cebada, pulpa de cítricos, suero), pero en

general, a niveles de inclusión muy bajos. Las principales fuentes de energía son la cebada y el trigo; de fibra, la alfalfa y la paja, aunque el salvado de trigo o el gluten feed también forman parte de la mayoría de los piensos; y de proteína, la soja y el girasol. Los piensos comerciales presentan grasa añadida, pero su contenido es siempre inferior al 3%.

No se incluyen en este conjunto los piensos experimentales con niveles de grasa o de pulpas de remolacha superiores a los habitualmente presentes en piensos comerciales.

Tabla 9. Composición en las principales materias primas (%) de los piensos españoles.

Piensos comerciales (n=10)						Piensos experimentales (n=17)				
Materia prima	mín	m	máx	moda	d.e.	mín	m	máx	moda	d.e.
Alfalfa	15	30,15	48	33,5	9,95	10	27,43	58,2	33	12,23
Salvado	15	23,86	32	24,4	7,37	0	21,39	70	0	21,13
Soja	0	1,57	7,25	0	2,66	0	7,48	17,9	6	5,38
Girasol	0	10,19	14,6	11	4,50	0	7,29	32	0	8,71
Cebada	0	5,83	10,86	6,3	3,34	0	22,75	50	10	17,64
Trigo	0	3,72	19	0	5,98	0	2,30	23	0	6,60
Paja	0	4,45	7,38	5	2,17	0	5,72	20	6	5,72
Grasa	0,5	1,52	3	0,5	0,97	0	0,50	2,98	0	0,95
Melaza	1,5	3,38	4	4	0,94	0	0,42	2,2	0	0,65
Pulpa R.	0	3,91	15	0	5,02	0	2,21	13	0	4,06

mín: valor mínimo; m: valor medio; máx: valor máximo; d.e.: desviación estándar

Por otra parte, se ha comprobado el comportamiento del método de digestión *in vitro* propuesto al aplicarlo a piensos con unas características particulares, debido a su composición en determinadas materias primas (fibras altamente digestibles o grasas) y

que, por tanto, difieren bastante de los piensos "normales" para conejos. Para ello, disponemos de 14 piensos experimentales utilizados en otros trabajos llevados a cabo en el Departamento. Ocho de ellos llevan **pulpa de remolacha**, 5 de ellos en sustitución de cebada (con un 15, 30, 35 ó 50%) y los 3 restantes en sustitución de heno de alfalfa (con un 10, 20 ó 30%). Su composición se describe en los trabajos de García *et al.* (1993) y Motta (1990), respectivamente. Seis piensos llevan **grasa** añadida (un 3% ó un 6%) y se describen en Fernández *et al.* (1994).

Todos estos piensos presentan un rango de dMS comprendido entre 56,7 y 70,3, es decir incluído en el rango de dMS de los 27 piensos que sirven de base para este trabajo.

Para llevar a cabo el tercer objetivo de esta tesis, se ha utilizado un total de 119 piensos procedentes de 5 países europeos. De ellos, **34** han sido suministrados por el Dr. Maertens (Government Research Station for Small Stock Husbandry, Merelbeke, Bélgica); **19** por el INRA (Station de Recherches Cunicoles, Castanet Tolosan, Francia); **17** por el Dipartimento de Scienze Zootechniche de la Universidad de Padua (Italia) y **22** por el Instituto Superior de Agronomía de la Universidad de Lisboa (Portugal). Los **27** piensos restantes son los ya utilizados para el primero de los objetivos de esta tesis doctoral, es decir los valorados en España.

Los coeficientes de digestibilidad *in vivo* habían sido obtenidos en sus respectivos lugares de origen mediante la metodología normalmente empleada por cada uno de estos equipos de trabajo para sus ensayos de digestibilidad¹. Los análisis de composición química han sido realizados en el laboratorio de nuestro Departamento de Madrid.

En la **Tabla 10** figuran los valores medios de composición química y de digestibilidad de la MS de los piensos por países, así como sus valores extremos y

¹ Hasta ahora la metodología para llevar a cabo las pruebas de digestibilidad de piensos para conejos, no había sido estandarizada. Sin embargo, existe ya un método de referencia (Pérez *et al.*, 1995) elaborado por el European Group of Rabbit Nutrition -EGRAN-, tras realizar un Ring Test sobre ensayos de digestibilidad entre los 6 laboratorios que componen dicho grupo de trabajo.

desviación estándar. No se incluyen los 27 piensos españoles pues ya figuran en la Tabla 8.

Todos son piensos experimentales (excepto 3 de Italia, y los ya mencionados 10 de España), de los cuales muchos habían sido diseñados para valorar distintas materias primas.

A la vista de la **Tabla 10**, y teniendo presente la Tabla 8, se puede decir que, en general, todos los piensos tienen un contenido medio en FB del 15%. El contenido en FAD es de un 20%, salvo en los piensos franceses que es más bajo (17%). Los valores medios de FND presentan, sin embargo, una mayor variación entre países, destacando particularmente el rango amplio que presentan los piensos de Francia.

En general la variabilidad de estos tres parámetros de fibra es menor en los piensos de Italia, Portugal y España que en los de Bélgica y Francia.

La PB es en media de un 18%, siendo su valor ligeramente menor en los piensos de Portugal (17%) y mayor en los de Bélgica (18,5%). En cuanto a la LAD, los piensos de Bélgica son los más lignificados (6%) y los de Portugal, los menos (3,7%).

El mayor rango de variación en los valores de dMS lo presentan los piensos de Bélgica (22 unidades), pues hay piensos con digestibilidades bajas (valor mínimo: 49%), siendo su valor medio el más bajo (61%). Los piensos de Francia son, por el contrario, los que tienen valores más altos (valor máximo: 79%), siendo su valor medio también el más alto (67,5%) y su rango de 19 unidades. Los piensos de Portugal presentan, sin embargo, un rango de variación muy estrecho (9,5 unidades), con valores comprendidos entre 60,4 y 70% (valor medio: 64%). Finalmente, los piensos de Italia y de España son bastante similares en cuanto a sus valores medios y rangos de dMS.

Las materias primas que entran a formar parte de los piensos procedentes de Bélgica, Francia, Italia y Portugal (n=92) son muchas y muy variadas, recogándose las principales en la **Tabla 11**. No se incluyen los 27 piensos de España pues sus

ingredientes ya figuran en la Tabla 9. En general todas ellas presentan amplios rangos de variación, excepto la grasa, pues estos piensos no llevan grasa añadida.

Tabla 10. Composición química (% SMS) y digestibilidad *in vivo* de la MS (%) de piensos de conejos procedentes de cuatro países europeos

Bélgica (n=34)					Francia (n=19)				Italia (n=17)				Portugal (n=22)			
	mín	m	máx	d.e.	mín	m	máx	d.e.	mín	m	máx	d.e.	mín	m	máx	d.e.
cen	6,17	7,73	9,58	0,87	5,64	7,75	9,67	1,40	6,71	8,14	8,89	0,61	5,85	7,87	11,51	2,01
FB	11,56	15,88	23,04	3,30	9,93	15,78	22,66	3,22	13,9	15,54	19,5	1,25	13,85	15,66	18,65	1,39
FND	26,86	35,38	41,75	4,34	21,7	33,88	43,2	6,30	30,15	34,71	41,23	3,21	25,5	30,95	36,31	2,38
FAD	14,62	20,01	27,1	3,66	10,24	17,58	25,39	3,80	17,55	20,03	24,4	1,71	17,35	19,33	22,25	1,57
LAD	4,35	5,94	8,72	1,33	2,37	4,33	8,81	1,59	3,86	5,18	8,32	1,27	2,23	3,68	6,27	0,85
PB	13,48	18,52	24,36	2,82	15,61	17,96	22,15	1,86	14,62	17,8	20,79	1,77	14,69	16,86	19,18	1,17
dMS	48,9	61	71	5,39	60,4	67,46	78,6	4,70	54,46	63,03	69,2	3,612	60,4	64,01	69,9	2,81
dMO	49,2	62,02	72,4	5,64	-	-	-	-	55,23	63,67	69,6	3,62	60,9	64,96	70,7	2,52
dEB	47,4	60,36	70,6	5,46	-	-	-	-	53,5	62,33	68,1	3,58	-	-	-	-

m: valor medio; mín: valor mínimo; máx: valor máximo; d.e.: desviación estándar;

cen: cenizas; FB: fibra bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente;

LAD: lignina ácido detergente; PB: proteína bruta; dMS: digestibilidad *in vivo* de la MS.

Los piensos de Bélgica son piensos diseñados para valorar un conjunto muy amplio y variado de materias primas. Para ello, el 30% de una dieta basal de alfalfa, trigo, torta de soja o de girasol y paja, se sustituye por cada ingrediente a valorar (diversos concentrados proteicos, cereales y salvados).

Los piensos de Francia están diseñados en función de la finalidad de cada trabajo, ya se pretenda valorar distintas fuentes de almidón, de fibra o el efecto de la sustitución de trigo por salvado de trigo.

De los 19 piensos de Italia, 3 son comerciales y el resto experimentales. Estos últimos están diseñados para estudiar distintos efectos (del nivel de almidón, del nivel

de proteína, del nivel de paja, etc), sobre la digestibilidad, bien de conejos en crecimiento o de hembras reproductoras.

Finalmente los piensos de Portugal están diseñados para valorar leguminosas. Para ello, en dietas basales a base de alfalfa, avena, paja y torta de soja, sustituyen esta última por distintas leguminosas, a niveles de sustitución de 10, 20, 30 ó 40%.

Tabla 11. Composición en las principales materias primas (%) de piensos procedentes de 4 países europeos (n=92).

Materia prima	mínimo	valor medio	máximo	d.e.
Alfalfa	0	22,53	74,6	12,78
Salvado	0	15,88	60	15,32
Soja	0	6,92	22	5,67
Girasol	0	4,54	36,6	6,84
Cebada	0	4,31	36	9,41
Avena	0	8,17	47	14,39
Trigo	0	7,43	60	12,10
Mandioca	0	2,40	30	4,53
Paja	0	4,39	15	5,35
Grasa	0	0,22	1,1	0,37
Melaza	0	2,32	8	1,73
Pulpa R.	0	1,17	30	3,97

d.e.: desviación estándar

III.2. ENSAYOS DE DIGESTIBILIDAD *IN VIVO*

Las instalaciones donde se ha llevado a cabo esta tesis doctoral son las pertenecientes al Departamento de Producción Animal de la E.T.S.I. Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid.

En los ensayos que se realizaron para la valoración de 13 piensos, del conjunto de 27 piensos utilizados para este trabajo, se utilizó un total de 156 conejos del tipo genético híbrido (Neozelandés x Californiano) procedentes de la nave de maternidad del propio Departamento. Se partió, para cada pienso, de 12 animales alojados en jaulas de metabolismo individuales de acero inoxidable de 41 x 24 x 31 cm que permiten la separación de heces y orina. Los animales, procedentes de camadas diferentes, se eligieron al azar. No se tuvo en cuenta ni el sexo ni la edad pero sí el peso inicial que fue, en media, de $1329,12 \pm 96,26$ g. Los animales se alojaron en una nave sin ventanas provista de aislamiento térmico de poliuretano expandido, con un sistema de ventilación dinámica. La temperatura se controló con un equipo calefactor aerotermo, siendo la temperatura media diaria de $18,6 \pm 2,8$ °C. En cuanto a la iluminación, se siguió un esquema de 12 h luz/12 h oscuridad.

Durante un período de adaptación al pienso de 7 d, los animales recibieron el alimento experimental *ad libitum*, controlando su consumo y el peso de los animales al inicio y al final de dicho periodo. No se impidió la coprofagia. Un sistema de bebederos automáticos de tetilla permitía a los animales disponer de agua de bebida *ad libitum*. La finalidad de este periodo de adaptación es que los animales se acostumbren a la dieta y a la jaula, y se elimine de su tracto digestivo todo resto de alimento consumido anteriormente.

Al final del periodo de adaptación sólo se conservaron, para cada dieta, entre 8 y 10 conejos (de los 12); en cualquier caso siempre se conservó el mayor número posible para continuar el ensayo. El peso medio de los animales al final del periodo de adaptación fue de $1633,27 \pm 148$ g.

Los criterios de eliminación fueron, por orden de importancia, los siguientes:

- deficiente estado sanitario: diarreas u otras enfermedades.
- despilfarro de alimento.
- excreción anormal de coprófagas.

Transcurrida la adaptación comenzó el período de colecta cuya duración fue de 2 periodos de 4 d consecutivos. Durante este tiempo se procedió a un control diario e individual del consumo de pienso y de la producción de heces duras.

Durante el período de colecta los animales recibieron también el alimento *ad libitum* y no se les impidió practicar la coprofagia.

Las heces frescas de cada conejo (heces duras y las blandas que hubiera) se recogieron y pesaron diariamente a la misma hora de la mañana. De ellas se tomó una muestra representativa (aproximadamente el 30%) que se introdujo en una bolsa de plástico identificada para cada animal y conservada a -18 °C. Las heces de los días siguientes se adjuntaron a la misma bolsa que contenía las de los días precedentes. Cuando se encontró una cantidad importante de pellets de pienso en la bandeja de las heces, éstos se agruparon y pesaron por separado para determinar la cantidad de alimento rechazado y corregir, en consecuencia, la cantidad de alimento ingerido. Se evitó la inclusión de pelo durante la colecta de heces.

Se anotó también el peso vivo de cada animal al final del periodo de colecta para controlar el crecimiento. Este peso fue, en media, de $1986,41 \pm 174,58$ g.

Concluido el periodo experimental (adaptación + colecta) se calculó, en primer lugar, el coeficiente de digestibilidad de la materia seca (dMS, %) para cada animal, en función de la MS ingerida y de la MS excretada durante los 4 d de colecta. Para ello fue necesario determinar la MS del alimento y de las heces. La MS del alimento se determinó a partir de una muestra de pellets obtenida progresivamente de los comederos el día que éstos se llenaron al principio del periodo de colecta. Dicha muestra se distribuyó en 3 bandejas conteniendo cada una de ellas aproximadamente 5 g y se introdujo en la estufa a 103 °C durante 24 h, ese mismo día. Para los cálculos de digestibilidad de MS de cada animal se usó la media de MS de las 3 bandejas. La MS de las heces de cada conejo se obtuvo distribuyendo las heces de cada animal en 3 bandejas de aproximadamente 40 g y, tras descongelarlas a temperatura ambiente, secándolas a 80 °C durante 48 h en estufa de ventilación forzada. El valor medio de

MS de las 3 bandejas se utilizó para los cálculos de digestibilidad de MS de cada animal.

La media de los coeficientes de digestibilidad de todos los animales utilizados para valorar un mismo pienso experimental es el valor de dMS para dicho pienso.

Además, se determinó el contenido en materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), y fibra bruta (FB) del pienso y de las heces de cada animal para obtener los coeficientes de digestibilidad de MO (dMO), PB (dPB) y FB (dFB) de cada pienso. Para ello fue necesario preparar tanto el alimento como las heces para los análisis químicos.

La muestra de pienso obtenida previamente se molió en un molino con criba de 1 mm y sobre ella se realizaron todos los análisis químicos (MO, PB, FB, FND). En primer lugar se determinó el contenido en MS sobre una muestra de 1 g a 103 °C/24 h, por duplicado. Esta segunda determinación de MS del pienso es necesaria para evaluar el efecto del almacenamiento y de la molienda sobre el contenido en MS y se debe realizar simultáneamente a la determinación de los demás constituyentes químicos de la dieta.

Las heces secas de cada conejo se molieron según el mismo procedimiento que el pienso y también se llevó a cabo una segunda determinación de MS a 103 °C, 24 h, sobre las heces molidas, por duplicado, y simultáneamente a la realización de los otros análisis químicos.

De los demás piensos utilizados en esta tesis, 9 habían sido valorados con la misma metodología y en las mismas instalaciones que los anteriores, ya que son piensos que han servido para otras investigaciones. Finalmente, los 5 piensos restantes habían sido valorados *in vivo* en el Departamento de Ciencia Animal de Valencia, utilizando una metodología cuyas principales diferencias respecto a la utilizada en Madrid son: se utilizaron animales adultos (de 91 d de edad); el control del consumo de pienso fue semanal; el periodo de colecta de heces fue de 7 d; la recogida

de heces fue diaria, individual y total, y se procedió al secado (80 °C, 24 h) de todas las heces excretadas por cada conejo durante los 7 d.

Los coeficientes de digestibilidad así obtenidos se utilizaron como valores de referencia para comparar los resultados de digestibilidad *in vitro* obtenidos a lo largo de esta tesis doctoral.

III.3. TÉCNICAS DE DIGESTIÓN *IN VITRO*.

III.3.1. Técnicas de tres pasos.

Se ha utilizado como base la técnica descrita por Boisen y Fernández (1991 b) en el Instituto de Ciencia Animal, Foulum, Dinamarca, a la que se han incorporado algunas modificaciones en las concentraciones enzimáticas y tiempos de incubación, con objeto de acomodarla al horario de una jornada laboral normal. Dicha técnica, que ha sido desarrollada para su aplicación en cerdos, está diseñada para utilizar un equipo básico de laboratorio y para permitir el análisis simultáneo de un gran número de muestras. Se han investigado también alternativas a esta técnica base.

La técnica base es una técnica multi-enzimática de tres pasos para simular la digestión a nivel del estómago e intestino delgado (pasos 1 y 2) y a nivel del ciego (paso 3), y se encuentra esquematizada en el **Esquema 1**.

Todas las muestras se analizan por duplicado, obteniéndose para cada una el valor medio de análisis. Los análisis se realizan en series de 35 matraces erlenmeyer. En cada serie, 32 de ellos contienen las muestras a valorar, 2 una muestra control y 1 es un blanco de reactivos (sin muestra), con el que se corrigen los valores de digestibilidad de cada serie de análisis.

Todas las muestras se muelen en un molino de laboratorio utilizando una malla de 1 mm de criba.

Primer paso.

Se pesa 1 g de muestra con una precisión de $\pm 0,1$ mg y se introduce en un matraz erlenmeyer de 100 ml con una barilla magnética en su interior. Se añaden 25

ml de una solución tampón fosfato (0,1 M; pH=6), Buffer A, y 10 ml de HCl 0,2 M y se mezcla en un agitador magnético. Se ajusta el pH a 2 con soluciones 1 M de HCl y de NaOH. A continuación se añade 1 ml de una solución de pepsina en HCl 0,2 M, conteniendo 25 mg/ml (porcine, 2000 FIP-Units/g de proteína, Merck n. 7190). Esta solución es inestable, por lo que debe prepararse inmediatamente antes de su utilización. Para prevenir la contaminación microbiana se añaden 0,5 ml de una solución de cloranfenicol (0,5 g/100 ml etanol). El contenido de cada matraz erlenmeyer se mezcla bien en un agitador magnético y se tapan los matraces con un tapón de goma antes de introducirlos en una estufa a 40 °C durante 1,5 h (primer periodo de incubación).

Segundo paso.

Al concluir el primer periodo de incubación se llevan a cabo los siguientes pasos: a cada mezcla se añaden 10 ml de una solución fosfato tamponada (0,2 M; pH=6,8), Buffer B, para mantener estable el pH, y 5 ml de una solución de NaOH 0,6 M, para neutralizar la solución. El pH se ajusta a 6,8 con HCl y NaOH 1 M. A continuación se añade 1 ml de una solución de pancreatina en buffer B, conteniendo 100 mg/ml (porcine, grade VI, Sigma n. P-1750). Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de su utilización, pues es inestable, y debe estar perfectamente homogeneizada. Tras la correcta mezcla del contenido de cada matraz erlenmeyer, éstos se tapan y se introducen de nuevo en la estufa a 40 °C durante 3,5 h (segundo periodo de incubación).

Tercer paso.

Utilización de **Viscozyme**: transcurrido el segundo periodo de incubación, se ajusta el pH a 4,8 con ácido acético, se añaden 0,5 ml de Viscozyme y se mezcla bien. Los matraces erlenmeyer se tapan de nuevo y se introducen una vez más en la estufa a 40 °C durante 16 h (hasta la mañana siguiente), lo que constituye el tercer periodo de incubación.

Utilización de **Celulasa**: tras la segunda incubación, se ajusta el pH a 5 con ácido acético y se añade 1 ml de Celulasa a cada matraz erlenmeyer. Tras una correcta agitación, se tapan y se llevan a la estufa a 40 °C durante 16 h (hasta la mañana siguiente), lo que constituye el tercer periodo de incubación.

Tras esta tercera incubación, los residuos no digeridos se recogen por filtración por vacío en un sistema Fibertec de Tecator, transfiriéndolos a crisoles de placa porosa (porosidad 2; 40-90 μm) previamente tarados a los que se ha añadido 0,3 g de celita 545 (Merck 2693). La celita es un polvo constituido en un 90% por SiO_2 que se utiliza como ayudante de la filtración. Esta operación se realiza mediante repetidos lavados de los matraces erlenmeyer y de los tubos del aparato con agua destilada a temperatura ambiente. Así se arrastran todas las partículas de muestra hacia los crisoles. A continuación se hacen dos lavados (de unos 50 ml) con etanol y otros dos con acetona.

Los crisoles con el residuo se introducen en la estufa a 103 °C, donde se secan hasta peso constante (hasta la mañana siguiente). Tras enfriarlos en un desecador, se pesan para obtener la MS indigestible *in vitro*. Si tras esta operación se introducen los crisoles en un horno a 550 °C durante 3 h, se dejan enfriar en un desecador y se pesan, se obtiene la cantidad de cenizas. La diferencia entre el peso tras el secado a 103 °C y el peso tras la incineración es la MO no digerida *in vitro*.

Para obtener la cantidad de PB no digerida, se despega de la base del crisol la MS indigestible rascando con ayuda de una espátula y se transfiere a tubos Kjeldhal para proceder al análisis de la PB.

La cantidad de FB y FND no digeridas se obtiene realizando los respectivos análisis sobre el residuo de MS indigestible.

Llamamos digestibilidad de la MS al porcentaje de MS solubilizado o desaparecido por el tratamiento *in vitro* descrito y definimos de la misma manera la digestibilidad de los demás nutrientes.

En los análisis de digestibilidad *in vitro* de la FB y de la FND se obtuvieron con frecuencia diferencias importantes entre las dos repeticiones de cada muestra. Debido a ello, y con el fin de no repetir el análisis de un número demasiado elevado de muestras, se aceptaron diferencias de hasta 4 unidades porcentuales, y sólo se repitió el análisis de las muestras cuyos dos valores diferían entre sí en una cantidad mayor. Estos resultados se pueden explicar por las pequeñas dificultades metodológicas que entraña el análisis de los componentes de la pared celular (FB, FND), ya que las diferencias que se obtuvieron para las dos repeticiones de la digestibilidad *in vitro* de la MS, MO y PB eran siempre mucho menores (máxima diferencia encontrada de 2 unidades).

En cada serie de análisis de digestibilidad *in vitro* de la MS según la técnica descrita (con Viscozyme), se incluyó una muestra control que se analizó por duplicado, sirviendo para calcular los índices de **repetibilidad** y de **fiabilidad** del método. Se eligió un pienso comercial cuya composición química presentaba valores intermedios dentro del rango de composición química del total de los piensos utilizados para evaluar dicha técnica *in vitro* (FB=17,86%; PB=18,5%).

El mismo pienso se sometió, además, a sucesivos análisis de FB y FAD, también por duplicado. Estos análisis se realizaron paralelamente a los análisis *in vitro*, a lo largo del tiempo, con el fin de obtener sus índices de repetibilidad y de fiabilidad. De esta forma se han podido comparar ambos índices entre esta técnica de digestión *in vitro* y los análisis de FB y FAD que se realizan de forma rutinaria en todo laboratorio de alimentación animal.

III.3.2. Técnicas de dos pasos.

III.3.2.1. Técnica sin pepsina/HCl.

Se añade a cada matraz erlenmeyer 25 ml de buffer A, 20 ml de buffer B y 5 ml de NaOH 0,6 M. Se ajusta el pH a 6,8 y se añaden 0,5 ml de cloranfenicol. A continuación se añade 1 ml de la solución de pancreatina en buffer B, conteniendo 100

mg/ml; se agitan, se tapan y se introducen de nuevo en la estufa a 40 °C durante 3,5 h, lo que constituye el primer periodo de incubación. El resto de la técnica es similar a la técnica base.

III.3.2.2. Técnica sin tercer paso.

Es la técnica base en la que se ha suprimido la tercera incubación.

III.3.3. Cálculos de digestibilidad *in vitro* de los distintos nutrientes.

III.3.3.1. Cálculo de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca y de la materia orgánica.

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (vMS) se calcula, para todos los métodos descritos, a partir de la MS de la muestra y del residuo previamente corregido por el blanco de la serie, mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ vMS} = [(\text{MS pienso} - \text{MS no digerida}) / \text{MS pienso}] \times 100 \quad \text{siendo:}$$

$$\text{MS pienso} = \text{peso muestra (g)} \times \% \text{ MS} / 100$$

$$\text{MS no digerida} = \text{peso (g) del residuo seco de la muestra} - \text{peso del residuo seco del blanco}$$

De la misma manera se calcula la digestibilidad *in vitro* de la MO (vMO):

$$\% \text{ vMO} = [(\text{MO pienso} - \text{MO no digerida}) / \text{MO pienso}] \times 100 \quad \text{siendo:}$$

$$\text{MO pienso} = \text{peso muestra (g)} \times (\% \text{ MS} - \% \text{ cenizas}) / 100$$

$$\text{MO no digerida} = \text{peso del residuo de la muestra desecada} - \text{peso del residuo de la muestra incinerada.}$$

Se comprueba que la celita es de naturaleza 100% mineral, por lo que no es necesario hacer una corrección de la MO no digerida de la muestra con la MO del blanco de celita (ya que es 0).

III.3.3.2. Cálculo de la digestibilidad *in vitro* de la proteína bruta.

La digestibilidad *in vitro* de la PB (vPB) se calcula según la siguiente expresión:

$$\% \text{ vPB} = [(\text{PB pienso} - \text{PB no digerida}) / \text{PB pienso}] \times 100 \quad \text{siendo:}$$

PB pienso = peso muestra seca (g) x % PB SMS/100

PB no digerida = PB del residuo de MS no digerida *in vitro* (g), calculada según la siguiente expresión:

$$1,4 \times N \times f \times 6,25 \times \text{ml HCl} / 100 \quad \text{donde:}$$

N = Normalidad del HCl.

f = factor de corrección de la Normalidad.

6,25 = factor de conversión del N en PB.

ml HCl = volumen empleado en la valoración del N de la muestra, corregido por el blanco de celita.

Se hizo un experimento preliminar para cuantificar el contenido en N de la celita. Para ello, se aplicó la técnica *in vitro* a blancos que contenían cantidades crecientes de celita: de 0,1 a 0,4 g, y se analizó el N de los residuos. Se comprobó que el volumen (ml) de HCl gastado para la valoración era muy pequeño e independiente de la cantidad de celita, por lo que se utilizó un valor medio para corregir: 0,0773 ml.

III.3.3.3. Cálculo de la digestibilidad *in vitro* de las fracciones fibrosas de la pared celular: fibra bruta y fibra neutro-detergente.

La digestibilidad *in vitro* de la FB (vFB) se calcula según la siguiente expresión:

$$\% \text{ vFB} = [(\text{FB pienso} - \text{FB no digerida}) / \text{FB pienso}] \times 100 \quad \text{siendo:}$$

FB pienso = peso muestra seca (g) x % FB SMS/100

FB no digerida = residuo, libre de cenizas, que queda tras someter a la MS no digerida *in vitro* al análisis de FB.

La digestibilidad *in vitro* de la FND (vFND) se calcula de la misma manera, con la FND del pienso y el residuo, libre de cenizas, que queda tras someter a la MS no digerida *in vitro* al análisis de FND.

III.3.4. Preparación de reactivos

Soluciones ajustadoras de pH

-Solución de NaOH 1 M: 40 g de NaOH en 1 l de agua destilada.

-Solución de HCl 1 M: 83,5 ml de HCl fumante 37% (Merck 317) en 1 l de agua destilada.

Buffer A (0,1 M, pH=6):

1,98 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6580)

+

29,44 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6345)

en 2 l de agua destilada.

Buffer B (0,2 M, pH=6,8):

19,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6580)

+

45,48 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6345)

en 2 l de agua destilada.

Solución de HCl 0,2 M: 16,7 ml HCl fumante 37% (Merck 317) en 1 l de agua destilada.

Solución de Na OH 0,6 M: 24 g Na OH en 1 l de agua destilada.

Solución de cloranfenicol: 0,5 g de cloranfenicol (Merck 2366) en 100 ml etanol 96%.
Conservar en refrigeración.

III.3.5. Complejos enzimáticos utilizados

La **pepsina** es un preparado enzimático purificado de mucosa gástrica porcina, con actividad proteolítica. Presenta una composición definida y estandarizada y es de fácil adquisición comercial. Se ha utilizado la de Merck, n. 7190. actividad 2000 FIP- Unidades/g de proteína, de uso muy común. Sus condiciones óptimas de actividad son: pH 1,6; temperatura 25 °C.

La **pancreatina** es un preparado enzimático de extracto de páncreas porcino que contiene todas las enzimas necesarias para degradar los nutrientes potencialmente digestibles: amilasa, lipasa, proteasa, tripsina y ribonucleasa. Tiene una composición definida y constante, ya que está purificada, y es de fácil adquisición comercial. Se ha utilizado la de Sigma, grade VI, n. P-1750. Sus condiciones óptimas de actividad son: pH 7,5-9; temperatura 40 °C.

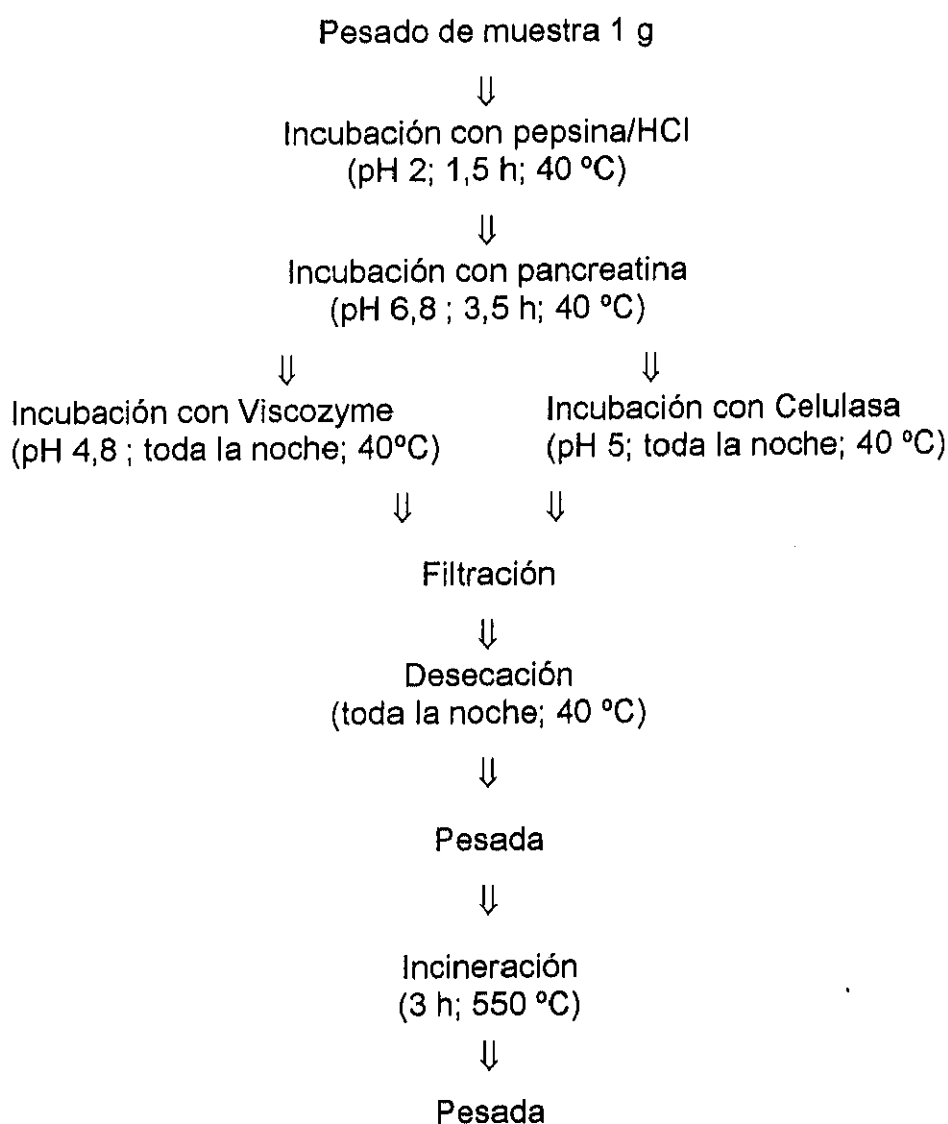
El **Viscozyme L** es un complejo multi-enzimático comercializado por los laboratorios Novo Nordisk. Está compuesto por una amplia gama de carbohidrasas que incluye celulasa, hemicelulasa, arabinasa, xilanasas, β -glucanasa y pectinasa; sin embargo, no contiene niveles significativos de actividad amilásica ni lipásica. Tiene una actividad declarada de 100 FBG/g. Este preparado enzimático, que se produce a partir de una cepa seleccionada del grupo de mohos *Aspergillus*, es capaz de degradar la fibra potencialmente fermentable, incluidos los polisacáridos no amiláceos. Además, al liberar materiales ligados (a la fibra), favorece la disponibilidad del almidón. También reduce la viscosidad. Sus condiciones óptimas de actuación son un pH de 3,3-5,5 y una temperatura de 40-50 °C.

La **Celulasa** es un preparado enzimático comercial producido a partir de *Aspergillus niger*. Se ha utilizado la de Sigma C-1184. Sus condiciones óptimas de actividad son: pH 5; temperatura 37 °C. De entre los diversos seres vivos con actividad celulolítica destacan los mohos. Hay relativamente pocas bacterias identificadas como

tales. Así, mohos pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Sporotrichum* y *Aspergillus* (entre otros) secretan un conjunto de enzimas hidrolíticas, conocidas generalmente como complejo celulásico o Celulasa.

Todos estos preparados enzimáticos están relativamente bien definidos y estandarizados y son fáciles de conseguir, por lo que son adecuados para análisis rutinarios.

Esquema 1. Esquema general de los métodos *in vitro* utilizados.



III.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS UTILIZADAS

Tanto en los piensos como en las heces y en los residuos de las digestiones *in vitro* se determinó el contenido en materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), fibra neutro-detergente (FND) y fibra ácido-detergente (FAD). En los piensos se determinó también la lignina ácido-detergente (LAD) y la energía bruta (EB). Previamente a su análisis, las muestras se molieron en un molino de laboratorio con una malla de 1 mm de criba. Todos los análisis se realizaron por duplicado, expresando los resultados sobre materia seca (sMS).

Los métodos de análisis utilizados fueron los siguientes:

- **MS:** se determinó por diferencia de pesada tras desecación de 1 g de muestra en estufa a 103 °C durante 24 h.
- **MO:** el contenido en cenizas se determinó por incineración de la muestra a 550 °C durante 3 h; y la MO como la diferencia entre la MS y las cenizas.
- **PB:** se determinó como N Kjeldahl x 6,25 (factor recomendado por la Federación Europea de Zootecnia). Se empleó 1 g de muestra y un equipo Kjeldahl de Tecator para las sucesivas operaciones de digestión de las materias nitrogenadas, destilación de NH₃ y valoración del mismo. El catalizador utilizado fue K₂SO₄.
- **FB:** se determinó según el método de Weende, como el residuo tras dos hidrólisis sucesivas de 1/2 h de duración cada una de 1 g de muestra en H₂SO₄ y KOH diluídos, en caliente.
- **FND:** se determinó por el método de Van Soest *et al.* (1991), como el residuo obtenido tras la solubilización del contenido celular en una solución de sulfato de lauril-sodio tamponada a pH 7 (solución neutro-detergente), en ebullición suave durante 1 h y lavado final con acetona.
- **FAD:** se determinó de manera no secuencial por el método de Robertson y Van Soest (1981), como la proporción de la muestra insoluble en una solución de bromuro de trimetil-cetil-amonio en ácido sulfúrico 1 N, (solución ácido-detergente), en ebullición suave durante 1 h y lavado final con acetona.

- **LAD:** se determinó sobre el residuo de FAD por el método de Robertson y Van Soest (1981): tratamiento del residuo de la FAD con H_2SO_4 al 72%, durante 3 h a 20 °C, para disolver la celulosa dejando como residuo la lignina con productos de Maillard y cenizas.

Para todos los tipos de fibra se utilizó un equipo de seis unidades Fibertec de Tecator.

- **Hemicelulosa:** calculada como la diferencia entre la FND y la FAD.
- **Celulosa:** calculada como la diferencia entre la FAD y la LAD.
- **EB:** se determinó mediante la combustión de las muestras en una bomba calorimétrica adiabática tipo IKA.

III.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se han introducido en la hoja de cálculo LOTUS 123 y posteriormente analizado con los programas:

- Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1991).
- Statgraphics Plus 7.1.

La **distribución de las diferentes variables**, tanto de composición química como de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* se ha estudiado mediante el procedimiento UNIVARIATE del SAS.

El **test t de Student** se ha utilizado para comparar entre sí, dos a dos, los valores medios de digestibilidad obtenidos según los distintos métodos *in vitro* y también los valores medios de digestibilidad obtenidos *in vivo* con los obtenidos *in vitro*. Se han considerado significativos los valores de $p < 0,05$. Se ha utilizado el procedimiento MEANS del SAS.

El **análisis de correlación** se ha realizado con el procedimiento CORR del SAS. Se han obtenido las correlaciones existentes entre valores de digestibilidad *in vivo*, *in vitro* y parámetros químicos.

III.5.1. Regresión entre digestibilidad *in vivo* e *in vitro*.

De todos los piensos utilizados para analizar la digestibilidad *in vitro* según los métodos descritos, se habían determinado previamente los coeficientes de digestibilidad *in vivo* de la MS, MO, EB, PB, y FB, así como la ED. Con los resultados obtenidos *in vitro* en cada método, se han calculado ecuaciones de regresión lineal simple, mediante el procedimiento REG del SAS, del tipo:

$$y = a + b * x$$

en donde:

y = digestibilidad *in vivo*.

a = punto de corte con el eje de ordenadas.

b = coeficiente de regresión de la variable independiente x.

x = digestibilidad *in vitro* según el método utilizado.

Una vez fijado el modelo de regresión simple, se ha procedido al diagnóstico de la regresión, es decir a la contrastación de las hipótesis previamente fijadas en todo modelo. De esta manera se ha comprobado la bondad del ajuste de los datos al modelo. Las hipótesis son las siguientes:

- 1) linealidad.
- 2) media de los residuos = 0.
- 3) normalidad de los residuos.
- 4) variabilidad constante de los residuos (homoscedasticidad).
- 5) Independencia o incorrelación de los residuos.

La hipótesis 4 se contrasta mediante un **análisis de los residuos** de la ecuación (diferencia entre valores verdaderos y valores predichos) frente a los valores

predichos o frente a la variable independiente, y la hipótesis 5, frente a variables no incluidas en el modelo.

Mediante el análisis de los residuos se detectan, además, valores extremos y posibles datos aberrantes, indicadores de un mal ajuste.

La precisión de las regresiones se ha medido en términos de coeficiente de determinación (R^2) o varianza explicada (%), o coeficiente de correlación (r) y variación residual o desviación residual estándar (drs).

Además, se ha tenido en cuenta, también, la **incidencia de los errores analíticos en la precisión de las ecuaciones**. Para ello, se ha estimado el "error total de predicción" como la resultante del error del ajuste de los datos experimentales (variación residual del modelo o drs) y el error ligado a los errores analíticos de cada variable explicativa. El error total asociado a una ecuación de predicción se ha calculado según la expresión matemática propuesta por Alderman (1985):

$$\text{var } y = CME \left(1 + \frac{1}{n}\right) + 2 * b^2 * \sigma^2 \quad \text{donde:}$$

var y : varianza de la variable dependiente.

CME : cuadrado medio del error de la ecuación de regresión ajustada.

n : número de datos.

b : coeficiente del parámetro regresor (pendiente).

σ^2 : varianza del análisis de la variable regresora.

La σ^2 utilizada por Alderman (1985) es la varianza de reproducibilidad. Sin embargo, en esta tesis se ha utilizado la varianza de fiabilidad (variabilidad del análisis en nuestro laboratorio a lo largo del tiempo, entre series), por no disponer de los valores de reproducibilidad.

El análisis de **regresión múltiple, paso a paso**, se ha utilizado para detectar la relación más precisa entre la digestibilidad *in vivo* y la digestibilidad *in vitro* y parámetros químicos de la dieta.

III.5.2. Cálculo del índice de repetibilidad.

El índice de repetibilidad (r), (variabilidad del análisis en un mismo laboratorio, intra-serie) se ha calculado de dos maneras diferentes:

En primer lugar, utilizando el test de Student de comparación de medias de dos variables normales, caso de muestras pareadas (Snedecor y Cochran, 1971), para testar el siguiente contraste de hipótesis:

H_0 = la media de las diferencias es 0.

H_1 = la media de las diferencias es $\neq 0$.

En vez de dar el intervalo de confianza para la media de las diferencias, se ha elegido el **p-valor** asociado al estadístico **t** de este test como criterio para decidir dicho contraste de hipótesis, ya que este valor evalúa el grado de confianza con el que se acepta o rechaza la hipótesis nula del test. Así, en general, cuanto más próximo sea p a 1, mayor evidencia habrá para aceptar H_0 , mientras que cuanto más cercano sea a 0, con más confianza se rechazará H_0 . A título orientativo:

- si $p < 0,05$: se rechaza H_0 .
- si $p > 0,15$: se considera que no hay evidencia suficiente para rechazar H_0 , es decir que se acepta H_0 .
- si $0,05 < p < 0,15$: habrá que considerar las consecuencias prácticas de aceptar o rechazar la hipótesis.

Se ha considerado que este p-valor es el índice de repetibilidad.

En esta tesis se han utilizado 10 datos por duplicado de digestibilidad *in vitro* de la MS con tres pasos y Viscozyme en el tercero (vMS123vi), 12 de FB y 12 de FAD

para determinar el índice de repetibilidad de los respectivos análisis, mediante la obtención del p-valor utilizando el procedimiento UNIVARIATE del SAS.

En segundo lugar, el índice de repetibilidad para cada una de las tres variables (vMS123vi, FB y FAD) se ha calculado como una medida de la dispersión (el CV) de las varianzas entre cada pareja de valores, con respecto al valor medio de la variable cuya repetibilidad se desea conocer.

III.5.3. Cálculo del índice de fiabilidad.

La Fiabilidad (F) (variabilidad del análisis en un mismo laboratorio a lo largo del tiempo, entre series) se ha estimado, en nuestro laboratorio, mediante varios análisis del pienso testigo sin repetición (no por duplicado) a lo largo de 14 meses (a razón de 1 ó 2 análisis mensuales).

Se ha cuantificado el índice de fiabilidad mediante una medida de la dispersión de los n análisis del pienso testigo a lo largo del tiempo respecto a la media, independiente del número de datos: el coeficiente de variación (CV).

En esta tesis se han utilizado 30 datos de vMS123vi, 17 de FB y 13 de FAD para determinar el índice de fiabilidad de los respectivos análisis.

III.5.4. Comparación de líneas de regresión.

Se ha utilizado el método recomendado por Snedecor y Cochran (1971) para comparar, dos a dos, rectas de regresión. Dicho método consta de tres pasos:

1. Comparación de las varianzas residuales.
 2. Comparación de los coeficientes de regresión (pendientes).
 3. Comparación de los puntos de corte con el eje de ordenadas (intercept).
1. La homogeneidad de las varianzas residuales o cuadrados medios residuales o del error (CME) de cada ecuación se testa mediante una F de dos colas. Así, una

evidencia suficiente de heterogeneidad de varianzas residuales puede constituir por sí sola información suficiente de que las rectas no son iguales.

2. En el caso de homogeneidad de varianzas residuales, se comparan las dos pendientes mediante un test F para testar la hipótesis de que las pendientes son iguales, con una significación del 5%:

$$F_{g.l.} = \frac{SCE_2 - SCE_1}{CME_1} \quad \text{donde:}$$

SCE_2 = suma de cuadrados del error de un modelo de regresión global obtenido a partir de todo el conjunto de datos ($n_1 + n_2$), los que sirvieron para ajustar la primera recta (n_1) junto con los que sirvieron para ajustar la segunda recta (n_2) (Modelo 2).

SCE_1 = suma de cuadrados del error obtenida como el sumatorio de las SCE de las dos líneas que se desea comparar (Modelo 1).

CME_1 = cuadrado medio del error del Modelo 1.

Cuando el resultado indica diferencia de pendientes, se puede considerar finalizada la investigación. Si, por el contrario las pendientes son iguales y las líneas paralelas, se podría continuar con el siguiente paso de comparación de intercepts.

III.5.5. Validación de modelos de regresión.

La validación consiste en investigar la capacidad predictora de modelos desarrollados para ser utilizados como ecuaciones de predicción; en este caso del valor nutritivo de piensos para conejos.

Se han validado por una parte, las principales ecuaciones obtenidas en esta tesis (predicción de dMS y de dEB a partir de la digestibilidad *in vitro* de la MS: vMS123vi); y por otra, una selección de las principales ecuaciones de predicción de dEB según parámetros químicos (FAD o FB), existentes en la bibliografía. Para ello se han utilizado datos independientes, es decir parejas de valores de las variables dependiente e independiente que no han servido para elaborar los modelos. Estos

datos proceden de piensos de cuatro países europeos: un conjunto de 34 datos de piensos de Bélgica, de 19 de Francia, de 17 de Italia y de 22 de Portugal. Los valores de la variable dependiente (dMS ó dEB) se adjuntaron junto con los piensos desde sus respectivos lugares de origen, mientras que los valores de las variables independientes (vMS123vi, FAD y FB) se han obtenido en nuestro laboratorio.

Para comparar la capacidad predictora de los distintos modelos se ha utilizado el **Error Cuadrático Medio (ECM)**, definido como:

$$ECM = \frac{\sum (O - P)^2}{n} \quad \text{donde:}$$

O = valores observados de la variable dependiente.

P = valores predichos de la variable dependiente.

n = número de parejas de O y P que se comparan.

Los valores de ECM son, pues, una medida de la precisión de un modelo de predicción. Se ha utilizado el criterio de Fuentes-Pila *et al.* (1995) para determinar cuándo la precisión de un modelo de predicción se puede considerar aceptable o no. Estos autores definen el **Error de predicción** como:

$$\%Error = \frac{\sqrt{ECM}}{\bar{y}} \times 100 \quad \text{donde:}$$

\bar{y} = media de la variable dependiente observada del conjunto de datos independientes.

Se considera que cuando el error de predicción es menor del 10%, la predicción se puede considerar satisfactoria; si su valor está comprendido entre el 10 y el 20%, se considera relativamente buena o aceptable; y si es mayor del 20%, es insatisfactoria. De esta manera se obtiene un índice de la **Robustez de un modelo de predicción**: un modelo se puede considerar robusto si sus predicciones son al menos aceptables cuando se aplica a circunstancias distintas de las del conjunto de datos

que sirvieron para desarrollarlo. Se consideran más robustas las ecuaciones que tienen errores de predicción al menos aceptables con la mayoría de los conjuntos de datos independientes que aquellas que son muy satisfactorias con unos conjuntos de datos pero que presentan errores altos con otros. Este índice sirve para comparar modelos entre sí y permite seleccionar los más adecuados para la predicción.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. ESTANDARIZACIÓN LABORATORIAL DE UN MÉTODO DE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA *IN VITRO*.

Recordemos que el objetivo principal de esta tesis era desarrollar las bases de una técnica de digestión enzimática *in vitro* adecuada para predecir el valor nutritivo de piensos para conejos. Para ello, se han estudiado los resultados de las 4 técnicas probadas y se han obtenido las ecuaciones de predicción de la dMS, dEB, ED, dFB y dPB en función de los valores correspondientes de digestibilidad *in vitro* obtenidos según cada una de ellas. En los cinco subapartados siguientes se exponen estos resultados, lo que permite contrastar las hipótesis previamente planteadas sobre este primer objetivo.

IV.1.1. Técnica de digestión *in vitro* de 3 pasos con Viscozyme en el tercer paso.

En primer lugar, se han contrastado los valores de digestibilidad *in vitro* de MS, MO, PB, FB y FND obtenidos mediante la técnica de tres pasos, con Viscozyme en el tercer paso, frente a los correspondientes valores de digestibilidad *in vivo*. Esto ha permitido comprobar en qué medida esta técnica *in vitro* reproduce la digestión del animal. Los valores medio, mínimo y máximo y la desviación estándar se presentan en la **Tabla 12 a**. Se observa que los valores de vMS123vi y de vMO123vi presentan rangos de variación amplios (17 y 20 puntos, respectivamente) y están homogéneamente distribuidos (d.e.=3,76 y 4,28, respectivamente); el rango de vPB123vi es mucho más estrecho (11 puntos), presentando también una distribución uniforme (d.e.=2,45). Los valores de digestibilidad *in vitro* de los parámetros de fibra son los que presentan rangos más amplios (30 y 23 puntos, para la vFB123vi y vFND123vi, respectivamente), si bien hay que destacar unas d. e. muy elevadas (7,28 y 6,44, respectivamente).

En la **Tabla 12 b** se presentan, además, los valores medios de las diferencias entre valores de digestibilidad *in vivo* e *in vitro*., así como las d.e. de estas diferencias.

A la vista de la **Tabla 12** se puede decir que los valores de digestibilidad *in vitro*, en general, sobreestiman los valores de digestibilidad *in vivo*. En efecto, los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS (vMS123vi) son en media 4,09 puntos porcentuales mayores que los de digestibilidad *in vivo* de la MS (dMS), siendo esta diferencia significativa ($p<0,001$). Igualmente, los valores de vMS123vi son significativamente mayores ($p<0,001$) que los de digestibilidad de la energía bruta - dEB- (4,49 puntos).

Tabla 12

a. Valores de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* obtenidos mediante la técnica de digestión de 3 pasos con Viscozyme en el tercer paso (n=27).

	valor medio	mínimo	máximo	d.e.
dMS	62,07	55,20	72,00	3,52
dEB	61,66	55,60	69,50	3,26
ED	2646,27	2308,70	2984,33	157,54
dFB [†]	18,41	8,33	27,80	6,47
dPB	73,37	68,47	78,80	2,56
vMS123vi	66,16	58,25	75,12	3,76
vMO123vi	64,76	54,29	74,00	4,28
vFB123vi	13,83	0,74	31,30	7,28
vPB123vi	85,39	78,07	89,28	2,45
vFND123vi	23,14	13,84	37,39	6,44

b. Diferencias entre valores de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* (3 pasos, Viscozyme) (n=27)

a	b	a-b*	d.e. _{diff}	p
dMS	vMS123vi	-4,09	1,52	p=0,0001
dEB	vMS123vi	-4,49	2,26	p=0,0001
dFB [†]	vFB123vi	1,55	4,82	NS
dPB	vPB123vi	-12,05	2,68	p=0,0001

dMS, dEB, dFB, dPB: digestibilidad *in vivo* de la materia seca, energía bruta, fibra bruta y proteína bruta (%); ED: energía digestible (Kcal/Kg); vMS123vi, vMO123vi, vFB123vi, vFND123vi, vPB123vi: digestibilidad *in vitro* de la materia seca, materia orgánica, fibra bruta, fibra neutro detergente y proteína bruta (%).

[†]: n=17

*: valor medio de las diferencias; p=significación estadística; NS: no significativo ($p>0,05$); d.e.: desviación estándar; d.e._{diff}: desviación estándar de la diferencia.

Estas diferencias suponen, pues, un 6,6% más de digestibilidad de la MS *in vitro* que *in vivo*. Los resultados obtenidos se pueden explicar, en parte, por la pérdida de partículas de pequeño tamaño y de material soluble (minerales) que se produce siempre al filtrar dando lugar a residuos de la digestión *in vitro* menores y, por consiguiente, a valores de digestibilidad *in vitro* mayores. Esto constituye uno de los principales inconvenientes de los métodos *in vitro* de filtración y coincide con los resultados de Graham *et al.* (1989), que obtienen valores de digestibilidad de las cenizas *in vitro* mucho mayores ($57 \pm 9,1$ puntos porcentuales) que sus correspondientes valores de digestibilidad *in vivo*. Como, por otra parte, los valores de vMS123vi y los de digestibilidad *in vitro* de MO (vMO123vi) obtenidos en esta tesis son significativamente distintos ($p < 0,001$), cabe pensar que durante la filtración no se solubiliza y pierde el total de los minerales, sino sólo una parte.

Otra causa que puede contribuir a la sobreestimación de la digestibilidad es la contaminación endógena y microbiana que no existe en los residuos de la digestión *in vitro*, pero sí *in vivo*. Finalmente, el pequeño tamaño de partícula utilizado en los análisis *in vitro* podría también causar una mayor digestión.

Estos resultados indican, por tanto, que esta técnica de digestión *in vitro* es capaz de digerir en mayor proporción que el propio conejo. Resultados equivalentes observan Boisen y Fernández (1991a y b) con una técnica similar, tanto en piensos como en materias primas destinadas a la alimentación porcina. Según estos autores las digestibilidades *in vitro* de MS y de MO en general sobreestiman ligeramente las digestibilidades fecales de MS y de energía. Asimismo, en aves, Valdés y Leeson (1992) obtienen siempre valores de digestibilidad *in vitro* mayores que los valores de EMA, con una técnica a base de pepsina y pancreatina.

Por otra parte, no se encuentran diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la digestibilidad de la FB *in vitro* (vFB123vi) y los correspondientes valores de digestibilidad *in vivo* (dFB), (Tabla 12 b) lo que parece indicar que la FB sufre igual digestión *in vivo* que *in vitro*. En este caso, los resultados obtenidos no están de

acuerdo con los de Boisen y Fernández (1991a), que observan una mayor degradación de la fibra *in vitro*.

Sí hay una gran diferencia significativa ($p < 0,001$), sin embargo, entre los valores de digestibilidad de la PB *in vitro* (vPB123vi) y los de digestibilidad de la PB *in vivo* (dPB), siendo los primeros una media de 12,01 puntos porcentuales mayores, como puede apreciarse en la **Tabla 12 b**. Se digiere, por tanto, más proteína *in vitro* que *in vivo*. Estas diferencias en la digestibilidad de la proteína se pueden atribuir a que los valores obtenidos *in vitro* son valores de digestibilidad real mientras que los obtenidos *in vivo* lo son de digestibilidad aparente. En efecto, en el proceso digestivo del animal siempre se producen pérdidas de N endógeno y microbiano en las heces, lo que se traduce en una menor digestibilidad *in vivo* aparente de la proteína. El residuo *in vitro* está, sin embargo, libre de contaminación endógena o microbiana, por lo que todo el N presente en el mismo procede del alimento, tratándose, por tanto, de una medida de la digestibilidad potencial o real de la proteína.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos, en cerdos, en la mayoría de los trabajos revisados. Así, Boisen y Fernández (1991a) obtienen valores de digestibilidad del N *in vitro* con 2 pasos (pepsina y pancreatina) mayores (14 puntos porcentuales) que los de digestibilidad *in vivo* medidos a nivel fecal. Una diferencia parecida obtienen Cone y Van der Poel (1993) con una técnica similar y Graham *et al.* (1989) utilizando una técnica de una única incubación con fluido ileal. La diferencias que obtienen otros autores no son tan grandes: en torno a 4 puntos (Furuya *et al.*, 1979; Dierick *et al.*, 1985) y 1,35 puntos (Babinszky *et al.*, 1990), éstos últimos comparando valores de PD *in vitro* e *in vivo* a nivel fecal.

Algunos trabajos (Boisen y Fernández, 1991b, 1993 y 1995) consideran la diferencia entre los valores de digestibilidad *in vitro* (real) e *in vivo* (aparente) como pérdidas de N endógeno; además, encuentran que estas pérdidas se correlacionan con la MS indigestible a nivel ileal ($R^2=0,76$, $drs=3,8$, $n=10$ ó $R^2=0,61$, $drs=4,5$, $n=15$, en los dos últimos trabajos citados, respectivamente). Esta circunstancia permite corregir los valores de digestibilidad *in vitro* del N en función de ésta, y así poder

compararlos con los de digestibilidad *in vivo*. Esta correlación, sin embargo, no se da en nuestro trabajo, por lo que no es posible hacer una corrección de este tipo.

Por otra parte, en la bibliografía consultada no se han encontrado apenas estudios que cuantifiquen el N endógeno y microbiano en conejos, lo que no permite conocer la digestibilidad verdadera de la proteína en esta especie. Únicamente, estudios recientes llevados a cabo en el Departamento donde se ha realizado esta tesis (García *et al.*, 1994), han valorado la cantidad de N bacteriano en heces duras de conejo en torno al 30% del N total presente en las mismas. Esta es, más o menos, la diferencia que se observa entre los coeficientes de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* obtenidos en esta tesis.

Para terminar este apartado, y a la vista de todos estos resultados en global, se puede concluir que el hecho de que la MS se digiera más *in vitro* que en el animal vivo se puede explicar sólomente porque también se digiere más PB *in vitro*, ya que la fibra sufre igual digestión *in vitro* que *in vivo*.

En definitiva, estos primeros resultados indican que la simulación de la digestión no es perfecta mediante esta técnica *in vitro*. No obstante, como se ha comentado en el apartado II.2.4.1. de la revisión bibliográfica, ésto no debe invalidar la técnica, ya que aún es necesario estudiar cómo se comporta en la predicción del valor nutritivo de los piensos para conejos. Esto, que constituye uno de los objetivos de todo método de digestión *in vitro*, será estudiado a continuación.

La **Tabla 13** muestra la matriz de correlación entre valores de digestibilidad *in vivo* e *in vitro*. Como se puede apreciar, las mejores correlaciones para los valores de dMS, dEB y de ED se obtienen con los valores de vMS123vi, estando los valores de vMO123vi ligeramente peor correlacionados. Esto nos ha llevado a tomar la vMS123vi como referencia para obtener las ecuaciones de predicción tanto de dMS como de dEB y ED.

Las ecuaciones de regresión simple obtenidas se presentan en el **Cuadro 2**. La ecuación de predicción de dMS según la técnica de tres pasos con Viscozyme

(vMS123vi) es significativa ($p < 0,001$), presentando una alta correlación y buena precisión ($R^2 = 0,84$; $drs = 1,45$). También son significativas ($p < 0,001$) las ecuaciones de predicción de dEB y de ED, si bien presentan coeficientes de correlación más bajos ($R^2 = 0,64$ y $R^2 = 0,55$, respectivamente) y mayores desviaciones estándar residuales.

Tabla 13. Matriz de correlación entre valores de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* ($n = 27$)

	dMS	dEB	ED	vMS123vi	vMO123vi
dMS	1,00000*	0,94426	0,87973	0,91425	0,89343
	(0,0)	(0,0001)	(0,0001)	(0,0001)	(0,0001)
dEB		1,00000	0,94575	0,80138	0,78827
		(0,0)	(0,0001)	(0,0001)	(0,0001)
ED			1,00000	0,74098	0,73306
			(0,0)	(0,0001)	(0,0001)
vMS123vi				1,00000	0,97695
				(0,0)	(0,0001)
vMO123vi					1,00000
					(0,0)

Leyenda: ver Tabla 12; *: valores de coeficiente de correlación (r); los valores entre paréntesis representan el nivel de significación: $p <$

Una posible causa del empeoramiento de la predicción de la dEB y de la ED es la baja correlación encontrada en este trabajo entre dMS y ED ($R^2 = 0,77$) y entre dMS y dEB ($R^2 = 0,89$), como se puede apreciar en la **Tabla 13**. Otros autores (Battaglini y Grandi, 1984; De Blas *et al.*, 1984; Ortiz y De Blas, 1989; Lekule, 1990), obtienen valores de R^2 superiores a 0,94, al correlacionar dMS y dEB.

Del **Cuadro 2** se deduce que la variable que mejor se predice es la digestibilidad de la MS (ecuación 1). Se comprueba que esta ecuación constituye un buen modelo de regresión simple tras validar las hipótesis hechas inicialmente al formular el modelo: linealidad del modelo; media 0, distribución normal y variabilidad constante (homoscedasticidad) de los errores; y tras comprobar la no existencia de datos aberrantes. El ajuste, así como los límites de predicción para los valores

individuales y los límites de confianza ($p < 0,05$) para la media, están representados en la **Figura 1**. La **Figura 2** representa la homoscedasticidad de los errores.

Cuadro 2. Ecuaciones de regresión simple *in vivo/in vitro* con Viscozyme ($n=27$).

Ec.	y	x	a	b	R ²	drs	p
1	dMS	vMS123vi	5,49 ($\pm 5,02$) p=0,2846	0,86 ($\pm 0,08$)	0,84	1,45	0,0001
2	dEB	vMS123vi	15,74 ($\pm 6,87$) p=0,0306	0,69 ($\pm 0,10$)	0,64	1,99	0,0001
3	ED	vMS123vi	591,58 ($\pm 372,99$) p=0,1253	31,06 ($\pm 5,63$)	0,55	107,89	0,0001
4	dFB [†]	vFB123vi	5,73 ($\pm 3,48$) p=0,1210	0,75 ($\pm 0,20$)	0,50	4,73	0,0016
5	dPB	vPB123vi	35,20 ($\pm 15,93$) p=0,0366	0,45 ($\pm 0,19$)	0,19	2,35	0,0244

Leyenda: ver Tabla 12

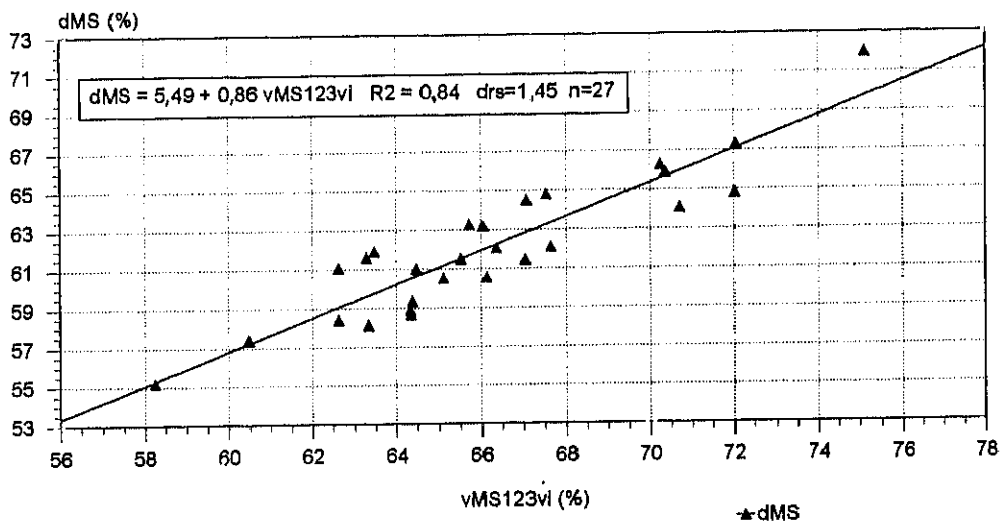
Modelo: $y = a + b \cdot x$

[†]: $n=17$

A la vista de la **Figura 1**, la disposición de los puntos uniformemente distribuidos a ambos lados de la recta de regresión explica el alto coeficiente de determinación obtenido ($R^2=0,84$). En cuanto a la segunda parte de la Figura 1, el IC para los valores predichos, se pueden interpretar de la siguiente manera: si un laboratorio, utilizando estas 27 muestras, obtuviera repetidamente rectas de calibración para predecir un nuevo valor de dMS con cada una de estas rectas, el verdadero valor de dMS se encontraría, el 95% de las veces, dentro de los límites de confianza para los valores predichos (línea de puntos externa). Se puede apreciar que la amplitud de este IC es constante a lo largo de toda la recta, lo que significa que la predicción es igual de buena para todo el rango de valores que se utilizaron para elaborar el modelo.

Figura 1.

a. Regresión entre digestibilidad *in vivo* (dMS) e *in vitro* (vMS123vi) de la MS.



b. Límites de confianza al 95% para la predicción y para la media.

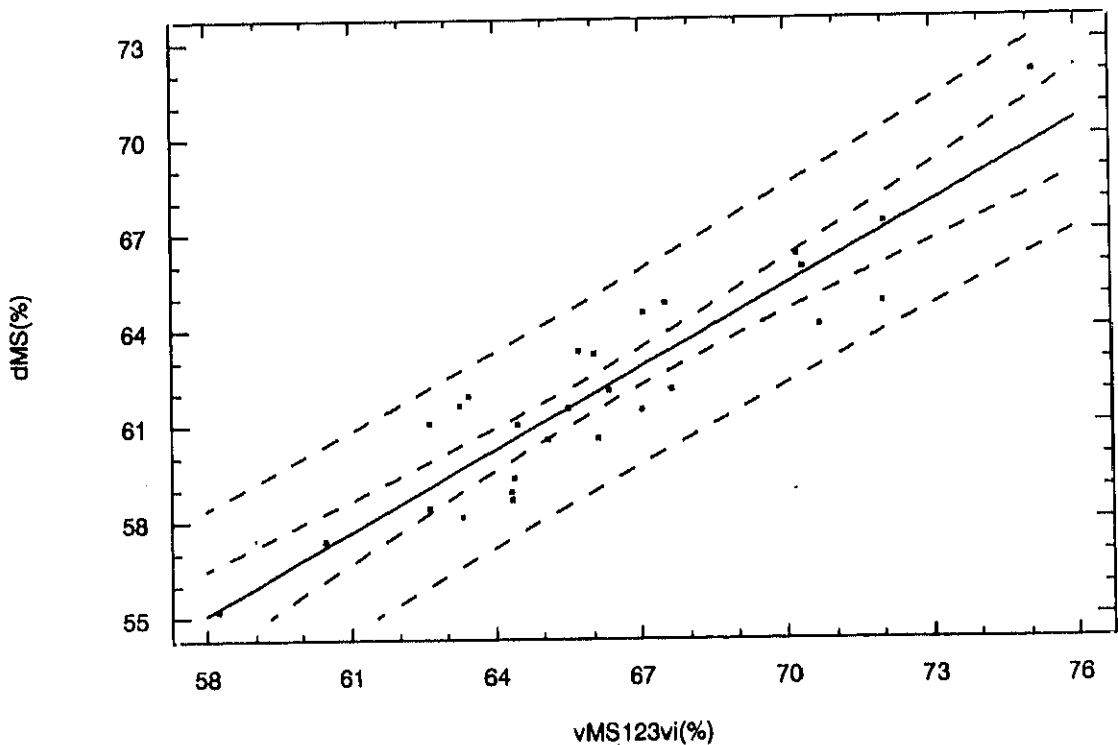
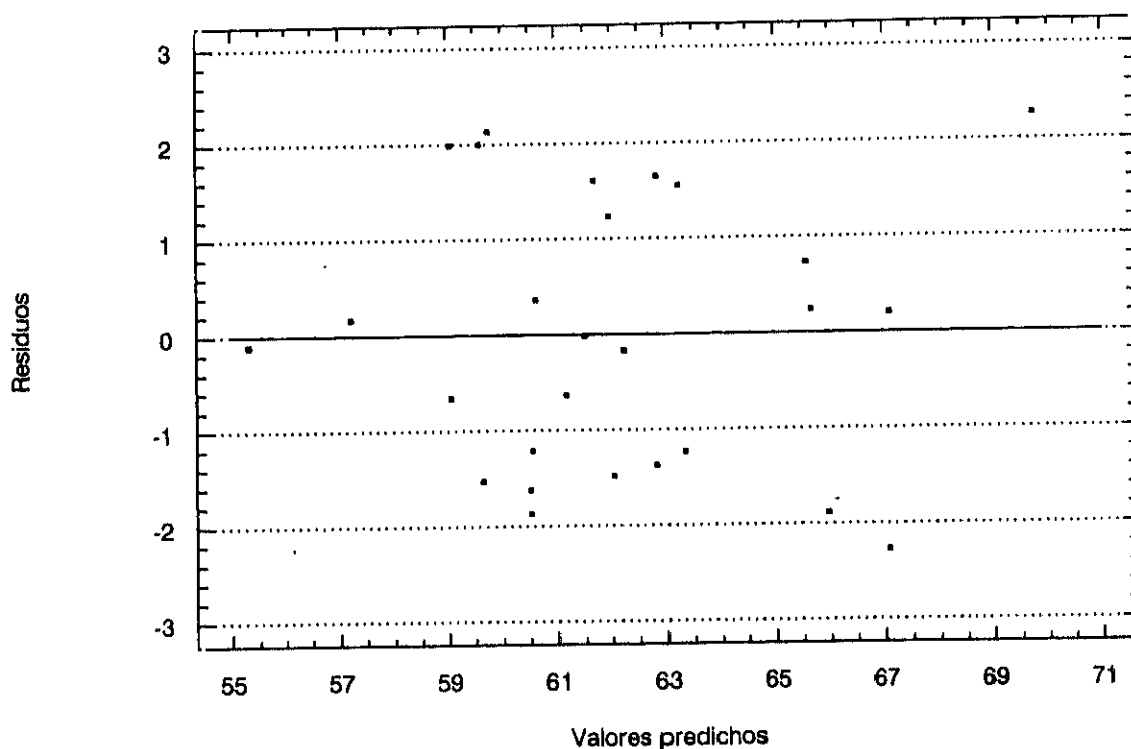


Figura 2. Gráfico de residuos de la regresión dMS vs. vMS123vi frente a los valores predichos.



En la bibliografía consultada no se han encontrado ecuaciones de predicción de la dMS en función de la digestibilidad *in vitro* de la MS para piensos de monogástricos. Únicamente Boisen y Fernández (1991a), en cerdos, obtienen, con su método de tres pasos, una ecuación para materias primas con una alta correlación y precisión ($R^2=0,92$, $drs=2,5$), si bien está basada en un número de datos escaso ($n=7$). Normalmente lo que se obtiene es ecuaciones de predicción de dE en función de la digestibilidad *in vitro* de la MO. Así, Boisen y Fernández (1991b) consiguen una buena estimación de la dE de 51 materias primas y de 52 piensos ($R^2=0,96$, $drs=3,2$ y $R^2=0,85$, $drs=2,2$, respectivamente). El mayor R^2 obtenido con las materias primas lo atribuyen los autores al mayor rango de digestibilidad de los piensos con respecto a las materias primas. La estimación de la dMS obtenida en esta tesis, con 27 piensos, es, pues, similar a la estimación de la dE obtenida por los citados autores, utilizando en ambos casos una técnica de digestión *in vitro* parecida.

En el análisis de residuos de la ecuación (1) frente a variables independientes no incluidas en el modelo, se obtiene correlación negativa con la FB ($r=-0,56$; $p=0,002$), y positiva con la ED ($r=0,49$; $p=0,009$), como puede apreciarse en las Figuras 3 y 4.

Figura 3. Gráfico de residuos de la regresión dMS vs. vMS123vi frente a la variable independiente FB.

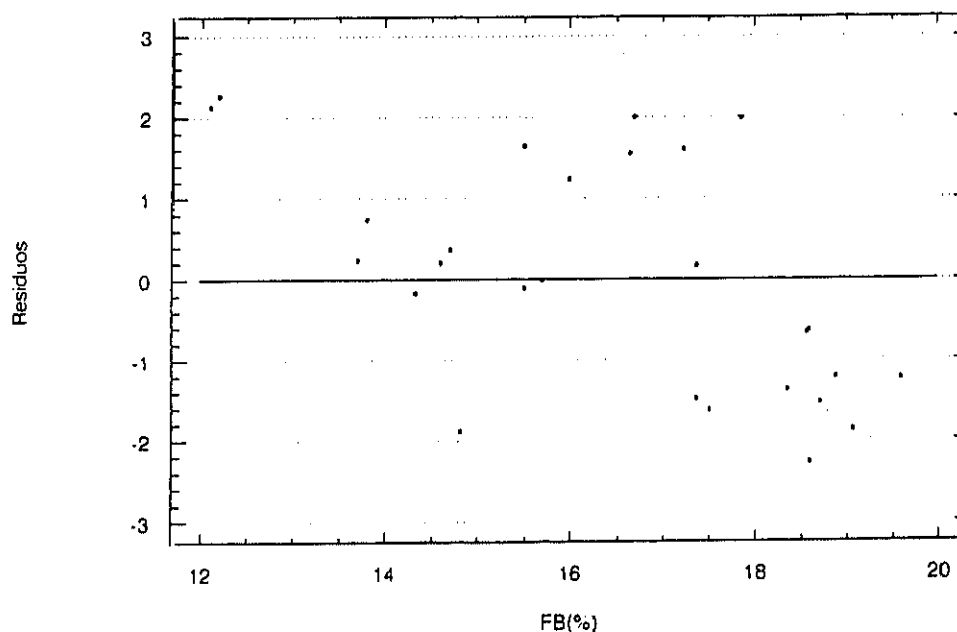
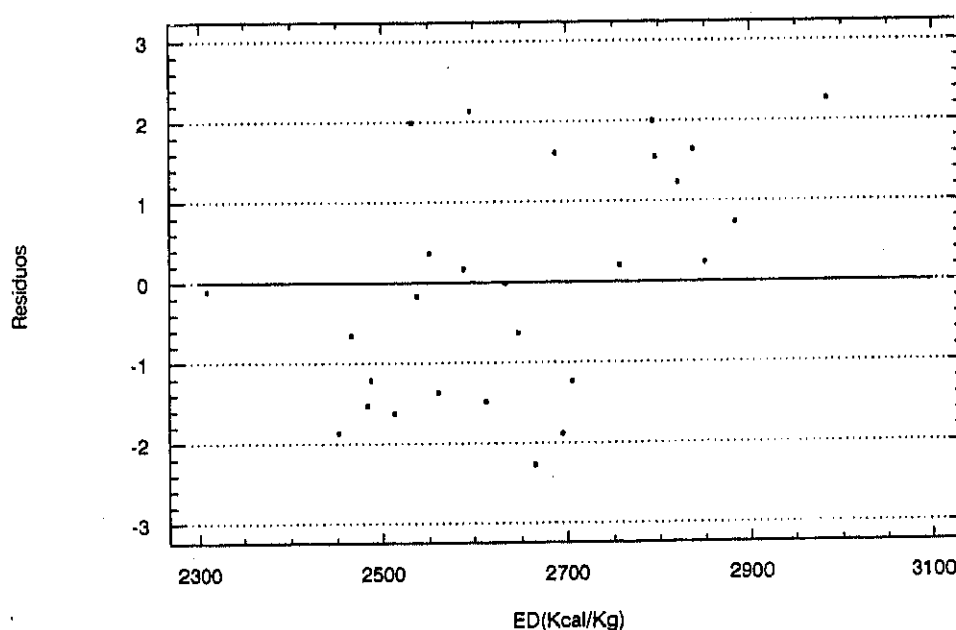


Figura 4. Gráfico de residuos de la regresión dMS vs. vMS123vi frente a la variable independiente ED.



Esto implica que la técnica enzimática utilizada tiende a sobreestimar la dMS de piensos bajos en ED (altos en fibra) y a subestimar aquellos altos en ED (bajos en fibra). Una posible explicación a estos resultados podría ser que en las técnicas *in vitro* no se tienen en cuenta las variaciones en el tiempo de tránsito digestivo producidas por distintos niveles de fibra (Fraga *et al.*, 1984; Gidenne, 1992 y 1994), y por tanto su influencia sobre la utilización digestiva del alimento. Efectivamente, al aumentar el nivel de fibra se provoca un aumento de la velocidad de tránsito y por consiguiente un TMR menor en el tracto digestivo, acortando el tiempo de degradación enzimática. Esto da lugar a valores de digestibilidad *in vivo* de la MS, MO y EB menores a los esperados, según apuntan diversos autores (Fraga *et al.*, 1984; Gidenne, 1992 y 1994). En la técnica *in vitro*, sin embargo, el tiempo de retención es siempre el mismo e independiente de la composición del pienso que se analice. Teniendo en cuenta el rango de fibra que tienen nuestros piensos (12,1-19,6% de FB; 29,3-43,5% de FND), se puede esperar un efecto sobre el tránsito y, por tanto, sobre la digestibilidad *in vivo* de la MS.

En principio, los resultados de este análisis de residuos indican la conveniencia de incluir las variables FB y ED en el modelo de regresión ya que mejoran la precisión. No obstante, la cuantía de esta mejora se comprueba haciendo un análisis de regresión paso a paso de la ecuación (1), incluyendo como posibles variables independientes la vMS123vi, la ED y diversos parámetros químicos (PB, FB, FND, FAD y LAD). Obviamente, la primera variable que alcanza la significación suficiente ($p < 0,15$) para entrar en el modelo es la vMS123vi. En el segundo paso entra la ED aumentando el R^2 hasta 0,93 y en tercer y último lugar entra la FAD consiguiendo aumentar el R^2 a 0,96. Cuando entre las posibles variables no se incluye la ED, la variable mejor correlacionada sigue siendo la vMS123vi y únicamente la FB alcanza el grado de significación suficiente para entrar en el modelo en segundo lugar, aumentando el R^2 a 0,90 y explicando, por tanto, un 7% más de la variación total.

En el **Cuadro 2** se muestra también la ecuación de predicción de la digestibilidad de la FB según los valores de digestibilidad *in vitro* de la FB con Viscozyme. Dicha ecuación (ec. 4) es significativa ($p < 0,05$) y presenta una correlación ($R^2 = 0,50$) y una precisión ($\text{drs} = 4,73$). Haciendo el análisis de residuos de esta ecuación frente a variables no incluidas en el modelo, se observa una tendencia positiva con la ED ($r = 0,70$; $p = 0,0019$) y negativa con la celulosa ($r = -0,58$; $p = 0,01$), sugiriendo la necesidad de incluir alguno de estos parámetros en el modelo. En efecto, se comprueba mediante un análisis de regresión paso a paso, que únicamente la variable ED mejora significativamente el ajuste. Dicha variable entra en el segundo paso y el modelo pasa a explicar ahora el 76% de la variabilidad de la dFB.

Vemos, pues, que los residuos de la ecuación de predicción de dFB siguen las mismas tendencias que los de la ecuación de predicción de dMS; es decir que cuanto mayor es el nivel de fibra del pienso, mayor digestión sufre la FB *in vitro* o menos se digiere *in vivo*. En efecto, se podría pensar que el complejo multi-enzimático empleado en esta técnica de digestión *in vitro* (Viscozyme) tiene enzimas degradadoras de la fibra más activas que el propio conejo y que actúan mejor en presencia de niveles altos de fibra. Por otra parte, es posible que haya interacciones entre la fisiología digestiva del conejo y los piensos con alto contenido en fibra, que den lugar a valores de digestibilidad *in vivo* de la fibra más bajos. La segunda de las posibilidades no es, sin embargo, probable; hay que tener en cuenta que un aumento del nivel de FB provoca un aumento de la FB cecal (Fraga *et al.*, 1984; Carabaño *et al.*, 1988) y un aumento de la actividad celulolítica (Boulahrouf *et al.*, 1987, citado por Fonty y Gouet, 1989), y por consiguiente, un aumento (y no una disminución) de la digestibilidad de la FB.

Finalmente, la ecuación de predicción de la digestibilidad de la PB (dPB) según la digestibilidad de la PB *in vitro* con Viscozyme (vPB123vi) es también significativa ($p < 0,05$) pero presenta un coeficiente de correlación muy bajo ($R^2 = 0,19$),

(Cuadro 2). Además, en el análisis de residuos de esta ecuación frente a parámetros químicos de la dieta no se aprecia ninguna tendencia.

IV.1.2. Técnica de digestión *in vitro* de 3 pasos con Celulasa en el tercer paso.

Efecto de la sustitución de Viscozyme por Celulasa.

La capacidad de simulación de la técnica de digestión *in vitro* de tres pasos con Celulasa en el tercer paso se ha comprobado estudiando los valores medios y extremos de digestibilidad *in vitro* de MS, FB y FND obtenidos. Estos valores se presentan en la **Tabla 14a**. Los valores de vMS123ce se distribuyen homogéneamente (d.e.= 3,7) y su rango es amplio (16 puntos), mientras que los rangos de los valores de vFB123ce y de vFND123ce que son más amplios (26 y 31 puntos, respectivamente), presentan unas d. e. muy grandes (>6%).

En la **Tabla 14 b** se presentan también los valores medios de las diferencias entre valores de digestibilidad *in vivo* e *in vitro*, así como las desviaciones estándar de estas diferencias. Según se puede apreciar, la MS se digiere peor *in vitro* al utilizar Celulasa en lugar de Viscozyme, siendo esta diferencia de digestibilidad significativa ($p<0,001$) y de 2,22 puntos en valor absoluto. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Givens *et al.* (1989). Estos autores, al comparar un método *in vitro* a base de pepsina/celulasa con otro a base de fluido ruminal/pepsina, utilizando pajas para alimentación de rumiantes, obtienen valores muy superiores con la segunda de estas técnicas. Es lógico pensar que con un conjunto enzimático más completo a efectos de digerir fibra, como el fluido ruminal, se obtengan valores de digestibilidad *in vitro* de la MO significativamente mayores que con la Celulasa por sí sola. Lo mismo sucede, en nuestro caso, con el Viscozyme, que es un preparado más completo que la Celulasa. También concuerdan con los resultados de Aufrère (1982). Esta autora prueba tres tipos de Celulasas en su técnica *in vitro* para rumiantes y observa que con la de la casa Sigma, de *Aspergillus niger*, el porcentaje de MS solubilizada es menos importante que con los otros dos preparados celulásicos (Celluclast y Onozuka, ambos

de *Trichoderma viridae*). La Celulasa Sigma es precisamente la que se ha utilizado en esta tesis.

La FND sufre menor digestión con Celulasa que con Viscozyme, apreciándose diferencias ($p < 0,05$) de 1,27 puntos, mientras que la digestión de la FB no es significativamente distinta ($p > 0,05$) según se emplee Celulasa o Viscozyme. Esto puede ser debido a la diferente composición de estos dos parámetros de la pared celular y de ambos preparados enzimáticos. Así, el hecho de que la FND esté constituida por los principales componentes insolubles de la pared celular vegetal (celulosa, hemicelulosa y lignina) puede explicar la mayor digestibilidad de la FND al utilizar Viscozyme ya que dicho complejo enzimático se compone de diversas hidrocarbonasas además de la celulasa propiamente dicha. Estos resultados también concuerdan, como veíamos anteriormente, con los de Givens *et al.* (1989). Por otra parte, la FB que se compone fundamentalmente de celulosa sufre igual digestión al utilizar el cóctel Viscozyme o la Celulasa sólo, ya que la celulasa del Viscozyme por sí sólo es suficiente para digerir la FB.

Por otra parte, los valores de digestibilidad *in vitro* de MS con Celulasa (vMS123ce) son también siempre significativamente mayores que los de dMS (una media de 1,87 unidades porcentuales) y que los de dEB (2,28 unidades porcentuales), indicando que es una técnica que, al igual que la anterior, también sobreestima la digestibilidad en el conejo. Estos resultados no concuerdan con los de diversos autores consultados (Aufrère, 1982; Metz y Van der Meer, 1985; Van der Meer y Pérez, 1992), que obtienen valores de digestibilidad *in vitro* de la MO (con Celulasa) menores que los de dMO.

Los valores de vFB123ce no son significativamente distintos de los de dFB, lo que parece indicar que la FB sufre igual digestión *in vivo* que *in vitro*.

Por consiguiente, se puede concluir que el hecho de que la MS se digiera menos con Celulasa que con Viscozyme se explica en parte porque también la FND se digiere menos. Sin embargo, así sólo se explican 0,51 puntos de la diferencia total

(2,22 puntos), quedando el resto sin explicar. Por otro lado, la digestión de la FB no contribuye a explicar la diferencia observada en la digestión de la MS según los dos preparados enzimáticos empleados en el tercer paso.

Tabla 14

a. Valores de digestibilidad *in vitro* obtenidos mediante la técnica de digestión de 3 pasos con Celulasa en el tercer paso (n=27).

	valor medio	mínimo	máximo	d.e.
vMS123ce	63,94	57,56	73,56	3,74
vFB123ce	13,51	0,00	26,02	6,75
vFND123ce	21,87	9,54	40,89	6,28

b. Diferencias entre valores medios de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* (3 pasos, Celulasa) y entre ambas técnicas de digestión *in vitro* de tres pasos (n=27).

a	b	a-b*	d.e. _{diff}	p
dMS	vMS123ce	-1,87	1,95	p=0,0001
dEB	vMS123ce	-2,28	2,37	p=0,0001
dFB [†]	vFB123ce	1,75	5,82	NS
vMS123vi	vMS123ce	2,22	1,56	p=0,0001
vFB123vi	vFB123ce	0,32	3,07	NS
vFND123vi	vFND123ce	1,27	3,08	p=0,042

dMS, dEB, dFB,: digestibilidad *in vivo* de la materia seca, energía bruta y fibra bruta (%); ED: energía digestible (Kcal/Kg); vMS123vi, vFB123vi, vFND123vi: digestibilidad *in vitro* de la materia seca, fibra bruta y fibra neutro detergente con Viscozyme (%); vMS123ce, vFB123ce, vFND123ce: digestibilidad *in vitro* de la materia seca, fibra bruta y fibra neutro detergente con Celulasa (%).

[†]: n=17

*: valor medio de las diferencias

p=significación estadística; NS: no significativo (p>0,05); d.e.:desviación estándar; d.e._{diff}: desviación estándar de la diferencia.

Para estudiar la capacidad predictora de esta técnica de digestión *in vitro* con Celulasa, se obtuvieron las ecuaciones de regresión simple entre los valores *in vivo* e *in vitro*, que presenta el **Cuadro 3**.

En este cuadro se puede apreciar que la ecuación de predicción de dMS según la técnica de tres pasos con Celulasa (vMS123ce) es significativa ($p < 0,001$) y presenta buena correlación y precisión ($R^2 = 0,74$; $drs = 1,84$). También son significativas ($p < 0,001$) las ecuaciones de predicción de dEB y de ED, si bien sus coeficientes de determinación son más bajos ($R^2 = 0,61$ y $R^2 = 0,53$, respectivamente) y sus desviaciones residuales estándar son mayores. El parámetro que mejor se predice es, por tanto, la dMS (ec. 6).

Cuadro 3. Ecuaciones de regresión simple *in vivo/in vitro* con Celulasa ($n=27$).

Ec.	y	x	a	b	R^2	drs	p
6	dMS	vMS123ce	10,51 ($\pm 6,19$) $p=0,1019$	0,81 ($\pm 0,10$)	0,74	1,84	0,0001
7	dEB	vMS123ce	18,31 ($\pm 6,99$) $p=0,0148$	0,68 ($\pm 0,11$)	0,61	2,08	0,0001
8	ED	vMS123ce	682,25 ($\pm 369,17$) $p=0,0765$	30,72 ($\pm 5,63$)	0,53	109,93	0,0001
9	dFB [†]	vFB123ce	7,98 ($\pm 4,37$) $p=0,0881$	0,63 ($\pm 0,25$)	0,30	5,61	0,0241

Leyenda: ver Tabla 14

Modelo: $y = a + b \cdot x$

[†]: $n=17$

En algunos trabajos en cerdos se encuentran ecuaciones de predicción de la dMO en función de la digestibilidad *in vitro* de la MO mediante una técnica de tres pasos con celulasa en el tercer paso. Así, Metz y Van der Meer (1985) obtienen un coeficiente de determinación de 0,72 ($drs=2,7$) con 16 piensos, y de 0,83 ($drs=3,8$) con 34 muestras (piensos y materias primas). Posteriormente, Van der Meer y Pérez (1992), con un número de datos alto ($n=89$ piensos), obtienen una buena estimación de la dMO ($R^2=0,85$, $drs=2$).

A la vista de las ecuaciones obtenidas con las dos técnicas de tres pasos descritas, se puede concluir que se consiguen mejores estimaciones de la dMS, dEB y ED cuando se utiliza el cóctel enzimático Viscozyme en el tercer paso de la técnica.

En un intento de explicar la peor predicción obtenida en nuestro trabajo al utilizar Celulasa en vez de Viscozyme en el tercer paso, se hizo el análisis de residuos de la ecuación (6) frente a variables no incluidas en el modelo. Se observó que el parámetro químico más correlacionado con los residuos fue la ED ($r=0,55$; $p=0,003$) seguido por la celulosa ($r=-0,42$; $p=0,03$). Los residuos de esta ecuación siguen, por tanto, las mismas tendencias que los de la ecuación (1), y por consiguiente, con este análisis de residuos no es posible explicar por qué la predicción con Celulasa es peor.

Por otro lado, la ecuación de predicción de la digestibilidad de la FB según los valores de digestibilidad de la FB con Celulasa es significativa ($p<0,05$) y presenta una correlación baja ($R^2=0,30$) y poca precisión ($drs=5,61$). (**Cuadro 3**). Mediante la técnica con Celulasa se consigue, pues, una peor estimación de la dFB que con la técnica de Viscozyme. En efecto, cuando se comparan las ecuaciones de predicción de la digestibilidad de la FB (ecs. 4 y 9), se observa que la predicción es peor según los valores de digestibilidad de la FB con Celulasa que con Viscozyme ($R^2=0,30$, $drs=5,61$ vs. $R^2=0,50$, $drs=4,73$), a pesar de que los valores de vFB123vi y vFB123ce no son significativamente distintos en valor absoluto (según se vió en la **Tabla 14 b**).

También en este caso se hizo el análisis de residuos de la ecuación (9) frente a variables no incluidas en el modelo, y se observó correlación positiva con la ED ($r=0,63$; $p=0,0062$) y negativa con la celulosa ($r=-0,57$; $p=0,02$).

En definitiva, una posible explicación a la peor predicción de la dMS según vMS123ce es, por tanto, que también se predice peor la dFB según vFB123ce.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos hasta ahora, se puede concluir que la mejor ecuación de estimación del valor nutritivo de piensos para conejos es la que correlaciona la digestibilidad de la MS con la digestibilidad *in vitro* de la MS mediante una técnica de tres pasos con Viscozyme en el tercero. Por consiguiente, en lo sucesivo tomaremos esta ecuación como base para futuras comparaciones.

IV.1.3. Efecto de la supresión del tercer paso en la técnica de digestión *in vitro*.

Partiendo de la técnica de digestión *in vitro* con 3 pasos y Viscozyme en el tercero de ellos, se ha estudiado la influencia de la incorporación de enzimas degradadoras de la fibra en los resultados obtenidos.

Los valores medios, mínimo, máximo y desviación estándar de digestibilidad *in vitro* obtenidos mediante la técnica de digestión *in vitro* sin el tercer paso, figuran en la **Tabla 15 a**. También se presentan los valores medios y las desviaciones estándar de las diferencias entre los valores de digestibilidad *in vitro* obtenidos con y sin el tercer paso, así como entre estos últimos y los valores de digestibilidad *in vivo* (**Tabla 15 b**).

Como se puede observar, las diferencias entre los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS sin el tercer paso (vMSno3) y de vMS123vi son significativas ($p < 0,001$) siendo los primeros 12 puntos porcentuales inferiores a los segundos. De la misma manera, la FB se digiere *in vitro* sin tercer paso 10,60 unidades porcentuales menos que con la técnica completa de tres pasos y la FND 12,37 puntos menos. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas entre la digestibilidad *in vitro* de la PB sin el tercer paso o con los tres pasos.

Estos resultados indican que la MS se digiere un 18,26% menos si no se incluye el tercer paso en la técnica *in vitro*, lo cual se podría explicar porque también la fibra sufre una digestión menor (un 76,64% menos en el caso de la FB y un 53,46% menos en el caso de la FND). La PB, sin embargo, se digiere en la misma medida se incluya o no el tercer paso, por lo que no explica las diferencias encontradas para la MS.

Por otro lado, la eliminación del tercer paso en la técnica *in vitro* conlleva la obtención de valores de digestibilidad menores significativamente que sus correspondientes valores *in vivo* para la MS, EB y FB. Estos resultados están de acuerdo con los de Xiccato *et al.* (1994), que obtienen valores de digestibilidad *in vitro* de la MO sin el tercer paso muy inferiores a los de dMO, en 19 piensos comerciales para conejos. Sin embargo, la PB sigue digiriéndose más *in vitro* que *in vivo* aunque no se incluya el tercer paso (**Tabla 15 b**), resultados que coinciden con los de Cone y Van

der Poel (1993), en cerdos, cuando comparan un método de digestibilidad *in vitro* de dos pasos (pepsina-HCl/pancreatina) con la digestibilidad aparente de la proteína a nivel ileal, en un conjunto de 48 materias primas.

Tabla 15

a. Valores de digestibilidad *in vitro* de la MS, FB, FND y PB (%) obtenidos mediante la técnica sin tercer paso (n=27).

	valor medio	mínimo	máximo	d.e.
vMSno3	54,08	48,50	61,60	3,14
vFBno3	3,19	-7,78	14,02	6,45
vFNDno3	10,76	-0,92	25,49	6,77
vPBno3	84,30	78,10	96,17	4,47

b. Diferencias entre valores medios de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* sin tercer paso y entre *in vitro* 3 pasos Viscozyme e *in vitro* sin tercer paso (n=27).

a	b	a-b*	d.e. _{dif}	p
dMS	vMSno3	7,99	1,86	p=0,0001
dEB	vMSno3	7,59	2,30	p=0,0001
dFB[†]	vFBno3	11,57	6,49	p=0,0001
dPB	vPBno3	-10,93	5,40	p=0,0001
vMS123vi	vMSno3	12,08	1,74	p=0,0001
vFB123vi	vFBno3	10,6	5,39	p=0,0001
vPB123vi	vPBno3	1,08	5,77	NS
vFND123vi	vFNDno3	12,37	3,16	p=0,0001

dMS, dEB, dFB, dPB: digestibilidad *in vivo* de la MS, EB, FB y PB (%); **vMSno3, vFBno3, vFNDno3, vPBno3:** digestibilidad *in vitro* de la MS, FB, FND y PB sin tercer paso.

[†]: n=17

*: valor medio de las diferencias

p=significación estadística; NS: no significativo (p>0,05); d.e.: desviación estándar; d.e._{dif}: desviación estándar de la diferencia.

Estos resultados confirman la necesidad de incluir el tercer paso en la técnica *in vitro* ya que, si se suprime, hay digestión incompleta de la MS en parte debida a que no se produce apenas digestión de la fibra, (el porcentaje de desaparición de la FB en

los dos primeros pasos es de un 6,6% y de la FND de un 10,76%). Esto indica que las enzimas degradadoras de fibra que se añaden en el tercer paso tienen un papel fundamental sobre la digestibilidad de la fibra. Dichas enzimas, sin embargo, no parecen tener ningún efecto sobre la digestibilidad de la proteína, ya que los resultados muestran que el 98% de la PB se digiere en los dos primeros pasos.

La necesidad de incluir, en las técnicas de digestión *in vitro*, un paso para simular la fermentación microbiana, ha sido ya constatada por diversos autores, en cerdos. Así, Furuya *et al.* (1979) observan que el fluido de yeyuno es insuficiente para digerir dietas con un contenido de FB mayor del 4%, ya que dicho fluido carece de las carbohidrasas microbianas indispensables para llevar a cabo la digestión de la fibra. De la misma manera, Löwgren *et al.* (1989) y Graham *et al.* (1989) comprueban que con fluido ileal o con extracto de heces, que contienen microorganismos, se consigue una mayor desaparición *in vitro* de la fibra que con fluido duodenal. Vervaeke *et al.* (1989), utilizando fluido ruminal para simular la fermentación que tiene lugar en el intestino grueso del cerdo, obtienen una buena estimación de la digestibilidad de la MO en este tramo del tracto digestivo. Boisen y Fernández (1991b) obtienen mejores correlaciones entre los valores de dE fecal y los de digestibilidad *in vitro* de la MO con una técnica de tres pasos (pepsina/pancreatina/enzimas degradadoras de la fibra) que entre la dE ileal y la digestibilidad *in vitro* de la MO con una técnica de dos pasos (pepsina/pancreatina). Finalmente, Van der Meer y Pérez (1992), citan un trabajo previo en el que comprobaron que la supresión de la incubación con Celulasa en su método *in vitro* de tres pasos, empeoraba la precisión de la predicción de la dMO (drs=3,5 vs. drs=2,5).

Por otra parte, la necesidad de simular la fermentación cecal del conejo ha sido también constatada en algunos trabajos. Así, Llopis y Fernández Carmona (1992) obtienen diferencias significativas entre los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS obtenidos con un método 2 pasos (pepsina/pancreatina) y los obtenidos al incorporar en la técnica un tercer paso con contenido cecal, siendo mayores en este último caso. Igualmente, Xiccato *et al.* (1994) observan que los valores de digestibilidad *in vitro* de

la MO obtenidos al no añadir ninguna enzima en el tercer paso son muy inferiores a los que se obtienen al añadir algún complejo enzimático para degradar la fibra y también a los de dMO.

La capacidad predictora de la técnica de digestión *in vitro* sin el tercer paso se ha estudiado, como en los casos anteriores, mediante la obtención de las ecuaciones de regresión que se presentan en el **Cuadro 4**.

La ecuación de regresión simple de la dMS según los valores de vMSno3 es significativa ($p < 0,0001$); sin embargo, su coeficiente de correlación ($R^2 = 0,72$) y su desviación estándar residual ($drs = 1,89$) son peores que en la ecuación (1).

Cuadro 4. Ecuaciones de regresión simple *in vivo/in vitro* sin tercer paso ($n=27$)

Ec.	y	x	a	b	R^2	drs	p
10	dMS	vMSno3	10,70 ($\pm 6,39$) $p=0,1065$	0,95 ($\pm 0,12$)	0,72	1,89	0,0001
11	dEB	vMSno3	20,07 ($\pm 7,51$) $p=0,0131$	0,77 ($\pm 0,14$)	0,55	2,22	0,0001
12	ED	vMSno3	735,60 ($\pm 384,85$) $p=0,0675$	35,33 ($\pm 7,11$)	0,50	113,91	0,0001
13	dFB [†]	vFBno3					NS
14	dPB	vPBno3					NS

Leyenda: ver Tabla 15

Modelo: $y = a + b \cdot x$

[†]: $n=17$

NS: no significativo ($p > 0,05$)

La inclusión del tercer paso aumenta, pues, la correlación entre los valores *in vivo* e *in vitro* de la MS y lo mismo sucede con la predicción de la dEB y de la ED (ecs. 11 y 12 vs. 2 y 3). Sin embargo, con la técnica sin tercer paso la predicción de la dMS es mejor que la predicción de la dEB y de la ED con la técnica de tres pasos. Según estos resultados se podría pensar en la posibilidad de elegir la ecuación (10) en vez de la ecuación (1) para la predicción de la dMS, ya que la supresión de la tercera incubación simplifica mucho el trabajo (acortando la duración de la técnica). Está

puede interesar ,a pesar de obtener peor correlación para la dMS ($R^2=0,72$ vs. $R^2=0,84$)

Las ecuaciones de predicción de dFB y de dPB no son significativas con la técnica de dos pasos y sí lo son con la de tres pasos (ecs. 13 y 14 vs. ecs. 4 y 5).

Con el propósito de intentar explicar la peor predicción de la dMS obtenida según los valores de vMSno3, se hizo un análisis de residuos frente a variables no incluídas en el modelo, y se encontró correlación positiva con la ED ($r=0,58$; $p=0,0016$).

IV.1.4. Efecto de la eliminación de la incubación con pepsina/HCl en la técnica de digestión *in vitro*.

Para estudiar el efecto de la incubación con pepsina/HCl sobre los valores de digestibilidad *in vitro* obtenidos, se ha comparado la técnica de tres pasos con Viscozyme frente a esta misma técnica a la que se ha suprimido el primer paso.

Los valores medios y extremos, junto con su variación, de digestibilidad *in vitro* obtenidos mediante la técnica de digestión *in vitro* sin pepsina/HCl, figuran en la **Tabla 16 a**. Además, en la segunda parte de la tabla se puede observar que los valores de vMSnope son significativamente menores ($p<0,001$) que los valores de vMS123vi (2,40 puntos); los valores de vFBnope son 3,87 puntos menores significativamente ($p<0,001$) que los de vFB123vi; y los de vPBnope son 4,32 puntos menores que los de vPB123vi. Sin embargo, los valores de vFNDnope no son significativamente distintos de los de vFND123vi.

Estos resultados indican que el primer paso de la técnica *in vitro* afecta a la digestibilidad de la MS, FB y PB de tal forma que, si se suprime, disminuyen sus digestibilidades. Sin embargo, esto no sucede en el caso de la FND.

Tabla 16

a. Valores de digestibilidad *in vitro* de la MS, FB, FND y PB (%) obtenidos mediante la técnica sin pepsina/HCl (n=27).

	valor medio	mínimo	máximo	d.e.
vMSnope	63,76	54,33	72,56	3,69
vFBnope	9,93	-3,03	21,83	7,10
vFNDnope	22,68	11,72	42,68	7,34
vPBnope	81,05	75,13	84,94	2,25

b. Diferencias entre valores medios de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* sin pepsina/HCl y entre *in vitro* 3 pasos Viscozyme e *in vitro* sin pepsina/HCl (n=27).

a	b	a-b*	d.e. _{diff}	p
dMS	vMSnope	-1,69	1,85	p=0,0001
dEB	vMSnope	-2,10	2,37	p=0,0001
dFB[†]	vFBnope	5,68	5,65	p=0,0008
dPB	vPBnope	-7,69	3,24	p=0,0001
vMS123vi	vMSnope	2,40	1,07	p=0,0001
vFB123vi	vFBnope	3,87	3,98	p=0,0001
vPB123vi	vPBnope	4,32	1,86	p=0,0001
vFND123vi	vFNDnope	0,46	3,15	NS

dMS, dEB, dFB, dPB: digestibilidad *in vivo* de la MS, EB, FB y PB (%); **vMSnope, vFBnope, vFNDnope, vPBnope:** digestibilidad *in vitro* de la MS, FB, FND y PB (%) sin pepsina/HCl.

[†]: n=17

*: valor medio de las diferencias

p=significación estadística; NS: no significativo (p>0,05); d.e. :desviación estándar; d.e._{diff}: desviación estándar de la diferencia.

En cuanto a la MS, nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Aufrère (1982). Estos autores utilizando un método a base de pepsina/celulasa obtienen valores de digestibilidad *in vitro* de la MO 7 puntos menores cuando no incluyen la predigestión con pepsina/HCl. La magnitud de la diferencia encontrada en nuestro trabajo no es, sin embargo, tan grande (2,4 puntos). Una disminución de 2,4 puntos porcentuales sobre una digestibilidad media de la MS de 66%, supone una disminución de digestibilidad de sólo un 6,3%. En el caso de la PB una reducción de 4,32 puntos sobre una digestibilidad media de la PB de aproximadamente 85% supone

sólamente una disminución de digestibilidad del 5%. Sin embargo, una disminución de 3,87 puntos porcentuales en la digestibilidad de la FB es más importante ya que, teniendo en cuenta que la digestibilidad de la FB es, en media, de un 14%, implica una disminución de digestibilidad del 28%. Por consiguiente, se puede afirmar que el primer paso o predigestión con pepsina/HCl tiene más importancia para la digestión de la fibra que para la de la proteína. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos de Dowman y Collins (1983). Según estos autores, la pepsina/HCl, además de provocar una primera ruptura del material proteico, lleva a cabo una predigestión de las paredes celulares haciéndolas más accesibles a las enzimas degradadoras de la fibra, facilitando así la digestión posterior de ésta. A su vez, Camus y Laporte (1980) constatan también la importancia de la pepsina, tras comprobar que ésta aumenta la solubilidad de la proteína y abre su estructura molecular, haciendo disponibles sus enlaces peptídicos a otras enzimas.

Por otra parte, los valores de vMSnope son mayores que sus equivalentes valores de digestibilidad *in vivo* -dMS y dEB- (1,69 y 2,1 puntos porcentuales, respectivamente); igualmente, la vPBnope es mayor que la dPB (7,69 unidades porcentuales); sin embargo, la FB sufre menor digestión que *in vivo* (5,68 unidades porcentuales). En efecto, aún cuando no se utiliza pepsina/HCl, los valores de digestibilidad *in vitro* de la proteína son mayores que los de digestibilidad *in vivo*, tal y como ocurría al utilizar el método de tres pasos (valores de vPB123vi). Por tanto, estos resultados se pueden explicar como en el caso anterior, es decir, por las pérdidas endógenas de N que tienen lugar *in vivo* pero no *in vitro*. En cuanto a la FB, el hecho de que sufra menor digestión que *in vivo* cuando no se utiliza pepsina/HCl, corrobora la importancia de esta preincubación para facilitar la posterior degradación de la fibra por las enzimas correspondientes.

En cuanto a la predicción según la técnica de digestión *in vitro* sin la preincubación con pepsina/HCl, las ecuaciones obtenidas se presentan en el **Cuadro 5**. La ecuación de regresión simple de la dMS según los valores de vMSnope es

significativa ($p < 0,0001$); sin embargo, su coeficiente de correlación ($R^2 = 0,76$) y su desviación estándar residual ($drs = 1,78$) son peores que en la ecuación (1). Estos resultados están de acuerdo con los de Aufrère (1982), que también obtienen una precisión ligeramente menor cuando relacionan la dMO con la digestibilidad *in vitro* de la MO sin pepsina ($drs = 4,1$) que cuando lo hacen con los valores de la técnica a base de pepsina/celulasa ($drs = 3,6$), en 7 forrajes para rumiantes.

Algo similar sucede para la estimación de la dEB. La estimación de la ED es, sin embargo, mejor al suprimir la incubación con pepsina/HCl ($R^2 = 0,59$ vs. $0,55$).

Por otra parte, la predicción de la dMS con la técnica sin pepsina es mejor que la predicción de la dEB y de la ED con la técnica de tres pasos. Esto sugiere la posibilidad de elegir la técnica más corta (por sus ventajas prácticas) para estimar la dMS a pesar de obtener un coeficiente de determinación menor que con la ecuación (1) ($R^2 = 0,76$ vs. $0,84$).

La dFB se estima peor si no se incluye el primer paso ($R^2 = 0,37$ vs. $0,50$), y la regresión entre dPB y vPBnope no es significativa.

Cuadro 5. Ecuaciones de regresión simple *in vivo/in vitro* sin pepsina/HCl ($n = 27$)

Ec.	y	x	a	b	R^2	drs	p
15	dMS	vMSnope	9,32 ($\pm 6,02$) $p = 0,1343$	0,83 ($\pm 0,09$)	0,76	1,78	0,0001
16	dEB	vMSnope	18,16 ($\pm 7,14$) $p = 0,0175$	0,68 ($\pm 0,11$)	0,59	2,1	0,0001
17	ED	vMSnope	563,15 ($\pm 350,57$) $p = 0,1208$	32,67 ($\pm 5,49$)	0,59	103,34	0,0001
18	dFB†	vFBnope	10,41 ($\pm 3,00$) $p = 0,0035$	0,63 ($\pm 0,21$)	0,37	5,32	0,0101
19	dPB	vPBnope				.	NS

Legenda: ver Tabla 16

Modelo: $y = a + b \cdot x$

†: $n = 17$; NS: no significativo ($p > 0,05$)

IV.1.5. Comparación global entre los métodos *in vitro* estudiados.

El **Cuadro 6** es un cuadro resumen de las correlaciones obtenidas entre la digestibilidad *in vivo* de la MS y las digestibilidades *in vitro* según los distintos métodos estudiados en esta tesis.

Cuadro 6. Correlación entre digestibilidad *in vivo* y digestibilidad *in vitro* de la MS (%) según las diferentes técnicas ensayadas (n=27).

Técnica <i>in vitro</i>	1 ^{er} paso	2 ^o paso	3 ^{er} paso	R ²	drs
vMS123vi	Pepsina/HCl	Pancreatina	Viscozyme	0,84***	1,45
vMS123ce	Pepsina/HCl	Pancreatina	Celulasa	0,74***	1,84
vMSno3	Pepsina/HCl	Pancreatina		0,72***	1,89
vMSnope		Pancreatina	Viscozyme	0,76***	1,78

***: p<0,001

vMS123vi: digestibilidad *in vitro* de la MS con Viscozyme; **vMS123ce**: digestibilidad *in vitro* de la MS con Celulasa; **vMSno3**: digestibilidad *in vitro* de la MS sin tercer paso; **vMSnope**: digestibilidad *in vitro* de la MS sin pepsina/HCl.

En todos los métodos estudiados se lograron ecuaciones de predicción del coeficiente de digestibilidad de la MS altamente significativas (p<0,001), siendo el método de digestión con 3 pasos y Viscozyme en el tercer paso (vMS123vi) el que presentó el mayor coeficiente de determinación ($R^2=0,84$) y la menor desviación residual estándar (drs=1,45), es decir mayor precisión, sobre todo el conjunto de piensos (n=27). Debido a ello, las comparaciones de los demás métodos ensayados en esta Tesis se han efectuado con referencia al mismo.

La utilización de Celulasa en lugar de Viscozyme en el tercer paso empeoró la predicción ($R^2=0,74$ vs. $R^2=0,84$) y también lo hicieron las técnicas parciales ,sin tercer paso y sin pepsina ($R^2=0,72$ vs. $R^2=0,84$ y $R^2=0,76$ vs. $R^2=0,84$, respectivamente).

Por otra parte, la estimación de la dMS es mejor con la técnica sin pepsina ($R^2=0,76$) que con la técnica de tres pasos con Celulasa ($R^2=0,74$) y que con la técnica sin tercer paso ($R^2=0,72$). Estos resultados indican que, acortando la técnica, se

obtienen también buenas estimaciones de la dMS, y que la estimación es mejor al eliminar la predigestión con pepsina/HCl que al suprimir la tercera incubación con enzimas degradadoras de la fibra. Por consiguiente, se puede sugerir acortar la técnica suprimiendo el primero, pero no el tercer paso.

IV.2. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE LA ECUACIÓN PROPUESTA EN LA PREDICCIÓN DEL VALOR NUTRITIVO DE DIETAS CON NIVELES ALTOS DE PULPA DE REMOLACHA O DE GRASA.

En la revisión bibliográfica de esta tesis ya se ha comentado que las ecuaciones de predicción existentes, basadas en parámetros químicos, se ven limitadas a la hora de estimar la dEB o la ED de materias primas altamente digestibles, como las pulpas de remolacha o de cítricos y las grasas. Presentan, además, el mismo inconveniente ante los piensos que incluyen estos ingredientes en su composición a niveles altos. Teniendo esto en cuenta, en este trabajo se ha estudiado la capacidad del método de digestibilidad *in vitro* propuesto para subsanar este inconveniente. Para ello se han analizado *in vitro* 14 piensos experimentales cuya composición incluye niveles importantes de las citadas materias primas. Los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS figuran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Digestibilidad *in vitro* de la MS (vMS123vi, %) y digestibilidad *in vivo* de la MS (dMS) de piensos experimentales de conejos con contenidos importantes de pulpa de remolacha o grasa.

	Pulpa Remolacha (n=8)				Grasa (n=6)			
	mín	m	máx	d.e.	mín	m	máx	d.e.
vMS123vi	65,63	71,47	78,48	4,36	62,21	62,85	63,99	0,65
dMS	58,8	66,44	70,3	4,07	56,76	58,33	59,33	0,93

mín: valor mínimo; m: valor medio; máx: valor máximo; d.e.: desviación estándar

El rango de dMS de estos piensos está incluido dentro del rango de los 27 piensos utilizados como base para todo el desarrollo de esta tesis; el rango de vMS123vi alcanza, sin embargo, valores más altos.

Los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS son siempre mayores que los de digestibilidad *in vivo* de la MS tanto en los piensos con pulpas como en los que llevan grasa: 5,03 unidades porcentuales en los de pulpas y 4,52 en los de grasas.

La ecuación de regresión obtenida entre dMS y vMS123vi, para estos 14 piensos experimentales es la siguiente:

$$(20) \quad dMS = 2,41 (\pm 5,82) + 0,89 (\pm 0,09) vMS123vi \quad R^2 = 0,90 \quad drs = 1,69 \quad p = 0,0001 \quad n = 14 \\ p = 0,6864$$

Esta ecuación se ha comparado con la ecuación general propuesta (ec. 1), mediante el método recomendado por Snedecor y Cochran (1971) para comparar líneas de regresión. No se han obtenido diferencias significativas (al 5%) en las varianzas residuales ni tampoco en las pendientes ($1-p=0,58$), lo que indica que ambas ecuaciones no difieren significativamente.

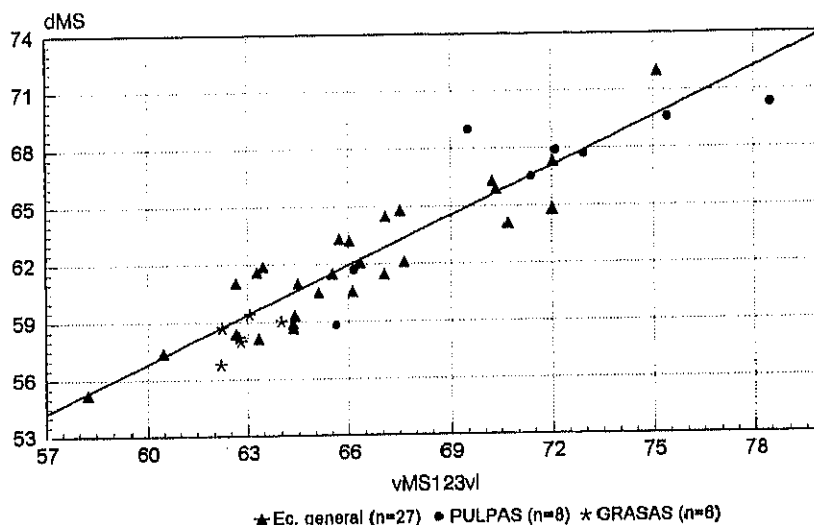
A la vista de estos resultados queda confirmada la capacidad de la ecuación propuesta para obtener estimaciones del valor nutritivo de piensos que se pueden calificar de "raros", ya que presentan niveles altos de pulpa de remolacha o de grasa en su composición. Se puede, por tanto, proponer la ecuación resultante de considerar un conjunto de 41 datos: los 27 que formaban la ecuación propuesta unidos a los 14 nuevos (pulpas y grasas). Dicha ecuación es la siguiente:

$$(21) \quad dMS = 4,67 (\pm 3,63) + 0,86 (\pm 0,05) vMS123vi \quad R^2 = 0,87 \quad drs = 1,52 \quad p = 0,0001 \quad n = 41 \\ p = 0,2055$$

Como se puede observar, los coeficientes de esta nueva ecuación son prácticamente iguales que los de la ecuación propuesta con 27 datos. La similitud de la pendiente (0,86) indica, además, una gran estabilidad del parámetro regresor (vMS123vi).

La representación gráfica del ajuste de los 14 piensos con pulpas o grasas a la ecuación general se muestra en la **Figura 5**.

Figura 5. Ajuste de piensos con pulpa de remolacha o grasa a la ecuación general



Por otra parte, cuando se comparan las ecuaciones de regresión obtenidas con la FAD como variable independiente, los resultados indican diferencias significativas entre la ecuación basada en 23 piensos y la ecuación basada en los 14 piensos "raros". En efecto, las varianzas residuales son distintas y también lo son las pendientes ($1-p=0,0013$): -1,40, en el primer caso y -1,07, en el segundo caso. Resultados similares se obtienen al comparar las ecuaciones de regresión obtenidas con FB. Estos resultados indican que ninguno de estos dos componentes de la pared celular se puede utilizar para obtener una buena estimación de la dMS de piensos con pulpa o con grasa.

IV.3. PREDICCIÓN SEGÚN PARÁMETROS QUÍMICOS DE LA PARED CELULAR.

El segundo objetivo de esta tesis se plantea comparar el coeficiente de digestibilidad *in vitro* de la MS frente a parámetros químicos de la pared celular, como variables independientes en una ecuación de regresión simple, para predecir el valor

nutritivo de los piensos para conejos. Para llevar a cabo este objetivo, se hizo un análisis de regresión paso a paso incluyendo únicamente variables químicas como posibles variables independientes (EB, PB, FB, FND, FAD y LAD). Tras comprobar que la variable mejor correlacionada era la FAD, y en su defecto, la FB, se obtuvieron las ecuaciones de regresión correspondientes, para los 27 piensos estudiados (**Cuadro 7**).

A la vista del **Cuadro 7 a**, se aprecia que, aunque las ecuaciones son altamente significativas, presentan valores muy bajos de R^2 , siendo siempre la FAD la que mejor se correlaciona. La representación gráfica de esta regresión se muestra en la **Figura 6**. Estas ecuaciones son, pues, siempre peores que las ecuaciones basadas en la digestibilidad *in vitro* de la MS (compárense con las del **Cuadro 2**).

Nuestros resultados, sin embargo, no concuerdan con los obtenidos por otros autores. En efecto, en la mayoría de los trabajos de la bibliografía consultada se proponen ecuaciones de predicción del valor energético de los piensos con FAD o con FB como variables regresoras. La FAD explica entre un 62 y un 89% de la variabilidad y la FB entre un 42 y un 76% (véase **Tabla 4**). La baja correlación encontrada en nuestro trabajo podría deberse, en primer lugar, al menor rango de FAD de nuestros piensos (14,75 - 23,17%), con respecto al que tienen la mayoría de los trabajos citados.

Por otra parte, es posible que alguno de los ingredientes que forman parte de alguna de las 27 dietas de este trabajo, afecten a la digestibilidad de un modo que no pueda ser explicado por un componente de la pared celular como la fibra. En este sentido, y teniendo en cuenta las observaciones de otros autores, se estudió cuáles eran los piensos que se desviaban de las ecuaciones de predicción. De Blas *et al.* (1992) observaron que las dietas con un contenido en paja mayor del 20%, se separaban de la recta de predicción. Por otro lado, Villamide (1989), en un intento de valorar materias primas con la ecuación de predicción propuesta por Ortiz y De Blas (1989) para piensos completos, observa que la digestibilidad de la energía del salvado

y de la paja es sobreestimada mientras que la digestibilidad de la energía de los concentrados proteicos se subestima por la ecuación. Parece lógico, pues, pensar que las dietas que presentan este tipo de materias primas se comporten de forma parecida.

Cuadro 7. Ecuaciones de regresión simple para la predicción de dMS, dEB y ED según parámetros químicos de la pared celular.

a. n=27

Ec.	y	x	a	b	R ²	drs	p
22	dMS	FAD	83,21 (±4,38) p=0,0001	-1,08 (±0,22)	0,49	2,57	0,0001
23	dMS	FB	77,35 (±4,51) p=0,0001	-0,93 (±0,27)	0,32	2,96	0,0022
24	dEB	FAD	80,48 (±4,33) p=0,0001	-0,95 (±0,22)	0,43	2,54	0,0002
25	dEB	FB	76,73 (±4,15) p=0,0001	-0,90 (±0,25)	0,34	2,73	0,0014
26	ED	FAD			0,24		0,009
27	ED	FB			0,22		0,013

b. n=23

28	dMS	FAD	89,99 (±3,39) p=0,0001	-1,40 (±0,17)	0,76	1,72	0,0001
29	dMS	FB	84,23 (±4,27) p=0,0001	-1,32 (±0,26)	0,56	2,34	0,0001
30	dEB	FAD	86,18 (±3,33) p=0,0001	-1,21 (±0,17)	0,71	1,68	0,0001
31	dEB	FB	82,33 (±3,69) p=0,0001	-1,21 (±0,22)	0,58	2,02	0,0001
32	ED	FAD			0,47		0,0003
33	ED	FB			0,48		0,0002

c. n=41

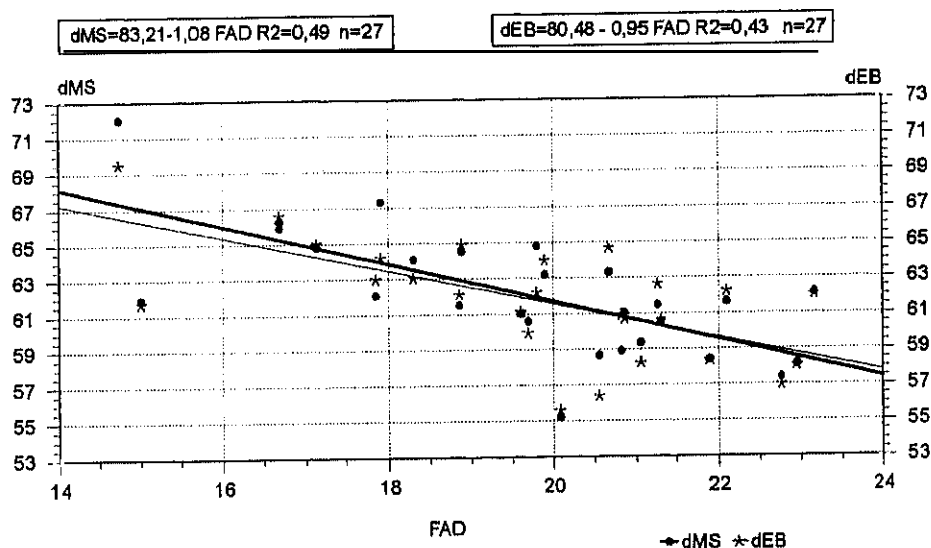
34	dMS	FAD	76,26 (±3,74) p=0,0001	-0,66 (±0,18)	0,27	3,57	0,0006
35	dMS	FB	76,12 (±4,02) p=0,0001	-0,80 (±0,23)	0,23	3,64	0,0014

Modelo: $y = a + b \cdot x$

Por eso, en este trabajo se suprimieron 4 dietas: dos de ellas por presentar un alto contenido en salvado (68 y 70%), otra por presentar un alto contenido en torta de girasol (32%) y una más por su alto nivel de paja (20%). Las ecuaciones de predicción para los 23 piensos restantes figuran en el **Cuadro 7 b**. Como se puede apreciar, la variabilidad explicada aumenta notablemente (i.e. el R² pasa de 0,49 a 0,76, al

predecir dMS con FAD, y de 0,32 a 0,56 cuando se utiliza la variable FB). Estos coeficientes de determinación, más próximos a los obtenidos en otros trabajos, significan una clara mejoría con respecto a nuestras predicciones anteriores y concuerdan con las hipótesis sugeridas por los citados autores respecto a la baja sensibilidad de los predictores químicos para dichas materias primas.

Figura 6. Regresión entre dMS ó dEB y FAD



Además se aprecia un cambio importante en los valores de la pendiente, según se considere la ecuación con 27 ó con 23 datos, indicando la falta de estabilidad de los parámetros regresores FAD y FB.

Por el contrario, cuando se excluyen estos 4 piensos de la regresión entre la dMS y la digestibilidad *in vitro* de la MS con Viscozyme, la ecuación que resulta con 23 datos presenta unos coeficientes similares a la ecuación con 27 datos ($a=4,89$; $b=0,86$), indicando, en este caso una gran estabilidad del regresor (vMS123vi). Esta nueva ecuación explica, además, un poco menos de la variabilidad de la variable dependiente -dMS- (un 83 en vez de un 84%). Por consiguiente, parece lógico considerar la ecuación original basada en 27 datos como la mejor y seguir proponiéndola. Esta ecuación resulta pues adecuada para predecir dietas con contenidos elevados de salvados, concentrados proteicos o paja.

En el **Cuadro 7 c** aparecen las ecuaciones obtenidas con 41 datos, es decir, cuando se incluyen los piensos de pulpas y de grasas ($n=14$). En este caso, se puede apreciar que las correlaciones obtenidas son aún peores que las que se obtienen con los 27 datos originales. Esto hace pensar en la incapacidad de los parámetros de fibra (FB y FAD) para estimar la dMS de los piensos con un contenido en pulpas o en grasa superior al normalmente presente en los piensos comerciales, tal y como han comprobado ya otros autores (De Blas *et al.*, 1984 y 1992; Maertens *et al.*, 1988; Ortiz y De Blas, 1989).

IV.4. ÍNDICES DE REPETIBILIDAD Y DE FIABILIDAD.

El índice de repetibilidad (r) se ha calculado, para los tres análisis laboratoriales (vMS123vi, FB y FAD) de dos maneras, según se explica en el material y métodos de esta tesis:

Cuando se utiliza el criterio del **p-valor** asociado al estadístico t del test de Student de comparación de medias de dos variables normales, caso de muestras pareadas, el índice de repetibilidad de la técnica de digestión *in vitro* propuesta en esta tesis (vMS123vi), calculado con 10 datos, es $p=0,7492$. Los valores de r de los análisis de FB y de FAD obtenidos con 12 datos, son $p=0,588$ y $p=0,30$, respectivamente. De estos resultados se deduce que, en nuestro laboratorio, la técnica *in vitro* propuesta es más repetible que ambos análisis químicos, y el análisis de FB lo es más que el de FAD.

Cuando el índice de repetibilidad se obtiene en forma de coeficiente de variación de repetibilidad (CV_r) o de desviación estándar de repetibilidad (S_r), los valores obtenidos son: 0,69% ($S_r=0,44$) para la técnica *in vitro* propuesta (vMS123vi), obtenido a partir de 10 datos; 1,78% ($S_r=0,32$) para el análisis de FB ($n=12$); y 1,72% ($S_r=0,38$) para el de FAD ($n=12$). De estos resultados se deduce que los tres análisis son muy repetibles en nuestro laboratorio siendo la técnica *in vitro* propuesta más repetible que ambos análisis químicos, y los análisis de FB y de FAD igual de repetibles.

En consecuencia, se puede determinar tanto la digestibilidad de la MS *in vitro*, como la FB y la FAD mediante análisis simples de cada muestra, no siendo necesarios los análisis por duplicado.

En la bibliografía consultada se han encontrado pocos datos sobre repetibilidad de análisis químicos en el laboratorio (**Tabla 3**). Alderman (1985) da valores para distintos parámetros químicos, y obtiene una alta repetibilidad para las cenizas y la PB (CV_r de 1,14 y de 1,02%, respectivamente), algo menor para la FB (CV_r de 1,72%) y baja para el EE (CV_r de 2,65%). Los valores obtenidos por Muñoz *et al.* (1994) son mucho mayores para todos los parámetros químicos analizados (CV_r de 4,49 y 5,24% para las cenizas y la PB, respectivamente; y 2,49% para la FND), indicando una baja repetibilidad. El valor obtenido en esta tesis para el análisis de FB (CV_r de 1,78%) se asemeja, por tanto, mucho al obtenido en el Ring Test de Alderman (1985), e indica una alta repetibilidad de este análisis. En cuanto a la repetibilidad del análisis de FAD, en la bibliografía consultada no se han encontrado valores para comparar, si bien el CV_r de 1,72% obtenido indica también una alta repetibilidad de este análisis.

También son escasos los datos bibliográficos sobre repetibilidad de técnicas de digestión *in vitro* (**Tabla 3**). Van der Meer (1984) obtiene valores de CV_r para los métodos Pepsina/Celulasa y FND/Celulasa comprendidos entre 0,62 y 3,43%; y según Alderman (1985) el CV_r para la segunda de estas técnicas es de 0,70%. El bajo CV_r obtenido en esta tesis (CV_r=0,69%) para el análisis de digestión *in vitro* de la MS según la técnica propuesta (vMS123vi) coincide, pues, con el del segundo de los autores citados y se encuentra en el límite inferior del rango encontrado por Van der Meer (1984). Esta técnica *in vitro* presenta, pues, una repetibilidad muy alta.

El índice de fiabilidad (F), expresado como coeficiente de variación de fiabilidad (CV_F) o como desviación estándar de fiabilidad (S_F), es 1,77% (S_F=1,14) para la técnica *in vitro* propuesta (vMS123vi), obtenido a partir de 30 datos, 4,26% (S_F=0,75) para el análisis de FB (n=17) y 7,87% (S_F=1,73) para el de FAD (n=13). Estos

resultados prueban que, en nuestro laboratorio, es más fiable el análisis de digestión *in vitro* que los análisis rutinarios de FB y de FAD, y el análisis de FB lo es más que el de FAD.

Como la técnica *in vitro* propuesta en esta tesis es un nuevo tipo de análisis, no ha sido aún probada en otros laboratorios. Por consiguiente no se dispone todavía de datos de digestibilidad *in vitro* que nos permitan obtener un índice de reproducibilidad (**R**) entre-laboratorios. Hasta que no se haga un Ring Test de esta técnica *in vitro* no sabremos su reproducibilidad.

La bibliografía no presenta valores de fiabilidad, pero sí de reproducibilidad de distintos análisis químicos y técnicas de digestión *in vitro* (**Tabla 3**). Así, el CV_R para la FB presenta valores comprendidos entre 4,5 y 8,87% (Alderman, 1985; Bailey y Henderson, 1990; Muñoz, 1991; Pérez *et al.*, 1995); para la FAD los valores rondan el 7% (Muñoz, 1991; Pérez *et al.*, 1995); y para la FND, oscilan entre un 2,3 y un 11,7% (Bailey y Henderson, 1990; Muñoz, 1991; Muñoz *et al.*, 1994). Los valores obtenidos en esta tesis para el índice de fiabilidad de la FB y de la FAD (4,26 y 7,87%, respectivamente) están, pues, en consonancia con los datos bibliográficos de reproducibilidad.

Por otra parte, el CV_R para el método Pepsina/Celulasa es de 9,15% (Van der Meer, 1984) ó de 15,77% (Muñoz, 1991); y para el de FND/Celulasa es menor de 2% (Alderman, 1985; Bailey y Henderson, 1990); de 6,47% (Van der Meer, 1984), ó de 13,81% (Muñoz *et al.*, 1994). Son pues, en general, valores elevados que indican una baja reproducibilidad de estas técnicas, normalmente menos reproducibles que los análisis de FB ó de FAD. Una posible explicación a este hecho es que las técnicas enzimáticas *in vitro* son todavía muy nuevas y requieren aún una mejor estandarización. Los análisis de FB y de FAD, sin embargo, están ya perfectamente estandarizados y se vienen utilizando desde hace mucho tiempo (Van Soest, 1963 y modificaciones).

Al comparar los valores de R existentes en la bibliografía con el bajo valor obtenido en esta tesis para el índice de fiabilidad de la técnica de digestión *in vitro*

propuesta ($CV_F=1,77$), vemos que sólo se asemeja a los valores de R de la técnica de FND/Celulasa obtenidos por Alderman, (1985) o por Bailey y Henderson (1990). Dicho valor es, además, mucho menor que los valores de R obtenidos en los demás Ring Tests citados, tanto para la técnica de FND/Celulasa como para la de Pepsina/Celulasa. Se trata, por tanto, de un análisis muy fiable, es decir que se repite muy bien a lo largo del tiempo en el mismo laboratorio. Es, además más fiable que los análisis de FB y de FAD, en nuestro laboratorio (2,4 y 4,4 veces, respectivamente).

A modo de conclusión, se puede decir que los resultados de r y F obtenidos en esta tesis indican una gran repetibilidad y fiabilidad para la técnica *in vitro*; mayor que para los análisis químicos de fibra. Además los análisis de FB y de FAD son igual de repetibles siendo el primero más fiable que el segundo.

En cuanto a la relación entre los valores de repetibilidad y de fiabilidad obtenidos en esta tesis, los CV_F son siempre mayores que los CV_r , indicando que los análisis de los tres parámetros son siempre menos fiables que repetibles. Así el CV_F es 2,6 veces mayor que el CV_r , para la técnica *in vitro*; 2,4 veces mayor para el análisis de FB y 4,6 veces mayor para el análisis de FAD. La relación existente entre los índices de repetibilidad y de reproducibilidad es, según Bailey y Henderson (1990), de aproximadamente la mitad o las dos terceras partes el primero del segundo.

IV.5. INCIDENCIA DE LOS ERRORES ANALÍTICOS DE LA VARIABLE REGRESORA EN LA PRECISIÓN DE LAS ECUACIONES DE PREDICCIÓN.

Toda ecuación de predicción lleva asociado un error debido al azar, expresado como la desviación estándar residual (drs), que es una medida aceptable de la precisión de la estimación de la variable dependiente. Sin embargo, además de este error debido al azar, se puede considerar también la variabilidad debida al análisis de la variable regresora en el laboratorio. En esta tesis se ha incorporado el error analítico al error debido al azar en las principales ecuaciones obtenidas.

Recordemos que, según Alderman (1985), para obtener una medida de la variabilidad total (error total de predicción) de una ecuación, se puede aplicar la siguiente expresión matemática:

$$\text{var } y = CME \left(1 + \frac{1}{n}\right) + 2 * b^2 * \sigma^2 \quad \text{donde:}$$

var y : varianza de la variable dependiente.

CME : cuadrado medio del error de la ecuación de regresión ajustada.

n : número de datos.

b : coeficiente del parámetro regresor (pendiente).

σ^2 : varianza del análisis de la variable regresora.

y $\sqrt{\text{var } y}$ es el error total de predicción buscado.

En esta tesis se ha considerado la σ^2 como la varianza de fiabilidad (S_F^2), siendo sus valores los siguientes:

$$S_F^2_{(VMS123vi)} = 1,30\%$$

$$S_F^2_{(FAD)} = 0,56\%$$

$$S_F^2_{(FB)} = 2,99\%$$

Los errores totales de predicción junto con las desviaciones residuales estándar (drs) de las principales ecuaciones obtenidas en esta tesis se recopilan en el **Cuadro 8**. A la vista de este cuadro se puede concluir que en este trabajo las ecuaciones de predicción de dMS según los valores de digestibilidad de la MS *in vitro*, presentan errores totales menores que las ecuaciones de predicción según FAD ó FB, siendo las ecuaciones basadas en la FB las que dan lugar a mayores errores totales. Por ejemplo, en el caso de las ecuaciones obtenidas con 41 datos, el error total de predicción aumenta un 77,8% cuando la variable predictora es la FAD y se duplica cuando se trata de la FB, con respecto al valor obtenido para la variable vMS123vi.

Cuadro 8. Error del ajuste del modelo y Error total de predicción de las principales ecuaciones obtenidas.

Ec. nº.	y/x [†]	n	drs	Error total	Incremento de la variación (%)
(1)	dMS/vMS123vi	27	1,45	2,02	39,31
(21)	dMS/vMS123vi	41	1,52	2,07	36,18
(22)	dMS/FAD	27	2,57	2,85	10,89
(28)	dMS/FAD	23	1,72	2,29	33,14
(34)	dMS/FAD	41	3,57	3,68	3,08
(23)	dMS/FB	27	2,96	3,78	27,70
(29)	dMS/FB	23	2,34	4,02	71,79
(35)	dMS/FB	41	3,64	4,17	14,56

dMS: digestibilidad *in vivo* de la MS; vMS123vi: digestibilidad *in vitro* de la MS con la técnica de tres pasos y Viscozyme en el tercero; FAD: Fibra ácido-detergente; FB: Fibra bruta.

† : variables dependiente (y) e independiente (x) de las ecuaciones; drs: desviación residual estándar.

Por otra parte, también se ha calculado el error total asociado a algunas de las principales ecuaciones de predicción encontradas en la bibliografía y recopiladas en la Tabla 4 de la revisión bibliográfica. Los resultados se muestran en el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Error del ajuste del modelo y Error total de predicción de algunas ecuaciones de la bibliografía.

Referencia	x	n	drs	Error total	Incremento de la variación (%)
Battaglini y Grandi (1986)	FAD	38	8,1	8,35	3,09
Maertens <i>et al.</i> (1988)	FAD	31	4,7	19,74	320
Maertens <i>et al.</i> (1988)	FB	31	5,11	60,62	1086,30
Ortiz y De Blas (1989)	FAD	175	4,21	4,39	4,28
Ortiz y De Blas (1989)	FB	219	6,02	6,96	15,61
De Blas <i>et al.</i> (1992)	FAD	66	2,2	2,55	15,9
De Blas <i>et al.</i> (1992)	FAD	93	3,8	4,06	6,84

x: variable independiente; drs: desviación residual estándar

Los errores totales de las ecuaciones de predicción de dMS según vMS123vi han resultado siempre menores que los de las principales ecuaciones de predicción según FAD ó FB existentes, como se aprecia en el **Cuadro 9** (2,07 vs. valores comprendidos entre 2,55 y 6,96%).

IV.6. VALIDACIÓN DE MODELOS DE REGRESIÓN.

El tercer objetivo de esta tesis, es decir la validación de ecuaciones de predicción, se ha llevado a cabo de dos maneras. Por un lado, se ha comprobado si la ecuación de predicción que se propone en este estudio es válida para predecir el valor nutritivo de dietas valoradas *in vitro* en nuestro laboratorio e *in vivo* en sus laboratorios de origen. Los resultados de esta comprobación se exponen en el apartado **IV.6.1**. Por otro lado, se ha procedido a la validación con datos independientes, tal y como se expone en el apartado **IV.6.2**.

IV.6.1. Análisis del comportamiento de la ecuación propuesta en esta tesis en la predicción del valor nutritivo de dietas valoradas *in vivo* en otros laboratorios.

Tomando como referencia la ecuación de predicción de la dMS con la vMS123vi obtenida con 27 piensos (ec. 1), se quiso estudiar cómo se comportaba esta ecuación a la hora de estimar la dMS de piensos que no habían servido para obtenerla. Para ello se disponía de piensos para conejos procedentes de cuatro países europeos, de conocida dMS, obtenida en sus respectivos lugares de origen. Dichos piensos se analizaron en nuestro laboratorio mediante el método de digestión *in vitro* de tres pasos con Viscozyme en el tercer paso, obteniendo sus valores de digestibilidad de la MS *in vitro*. Los valores medios junto con su rango de variación figuran en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Digestibilidad *in vitro* de la MS (vMS123vi, %) y digestibilidad *in vivo* de la MS (dMS) de piensos de conejos procedentes de cuatro países europeos.

	Bélgica (n=34)				Francia (n=19)				Italia (n=17)				Portugal (n=22)			
	mín	m	máx	d.e.	mín	m	máx	d.e.	mín	m	máx	d.e.	mín	m	máx	d.e.
vMS123vi	56,36	66,32	75,43	4,74	63,44	72,14	81,93	5,23	61,02	66,82	71,12	2,39	61,95	65,94	70,68	2,39
dMS	48,6	60,99	71	5,39	60,4	67,46	78,6	4,70	54,46	63,03	69,2	3,61	60,4	64,01	69,9	2,81

mín: valor mínimo; m: valor medio; máx: valor máximo; d.e.: desviación estándar

En esta tabla se puede apreciar que los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS son siempre mayores que los de digestibilidad *in vivo* de la MS, en los piensos de todos los países: 5,33 unidades porcentuales en los de Bélgica; 4,68 en los de Francia; 3,79 en los de Italia y sólo 1,93 en los procedentes de Portugal. Estos valores no difieren mucho del obtenido para los 27 piensos españoles (4,09 puntos).

El ajuste de todos los pares de valores a la recta obtenida con los 27 datos de España, se representa en la **Figura 7a** y los residuos en la **Figura 7b**.

A la vista de la **Figura 7 b** se aprecia que la ecuación de España sobreestima, en general, la dMS de los piensos de Bélgica y subestima la de los piensos de Portugal, dejando los residuos de los piensos de Francia e Italia uniformemente distribuidos a ambos lados del 0.

Las ecuaciones de regresión correspondientes a los datos de cada país figuran en el **Cuadro 10** y están, además, representadas gráficamente en la **Figura 8**.

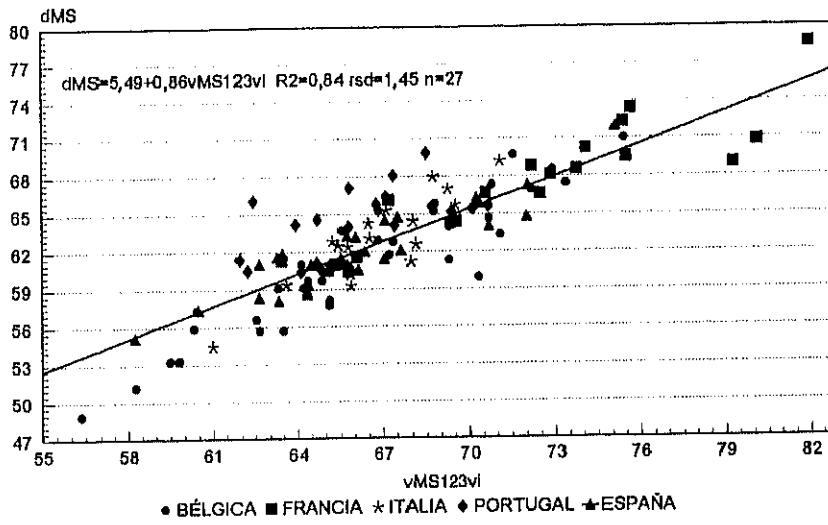
Como se puede apreciar en el **Cuadro 10**, todas las ecuaciones son altamente significativas y presentan buenos coeficientes de determinación (R^2 entre 0,77 y 0,87), salvo la ecuación de Portugal ($R^2 = 0,31$).

A continuación se comparó cada una de estas ecuaciones con la obtenida en España.

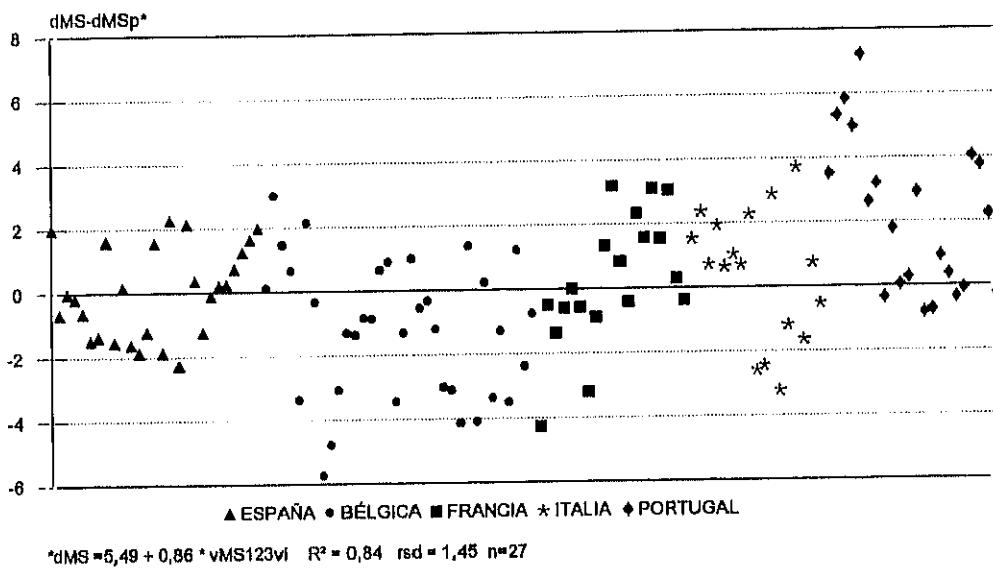
A la vista de la **Figura 8**, se aprecia que las pendientes de las ecuaciones de Bélgica, Italia y Portugal divergen de la pendiente de la ecuación de España, mientras que la pendiente de la ecuación de Francia se asemeja más. Para comprobarlo estadísticamente se utilizó el método de comparación de líneas de regresión propuesto por Snedecor y Cochran (1971). Los resultados obtenidos son los siguientes:

Figura 7

a. Ajuste de los pares de valores de todos los países a la ecuación obtenida en España.



b. Desviación de los valores predichos de los observados (residuos).



Cuadro 10. Ecuaciones de regresión para la predicción de la digestibilidad de la MS (dMS) según la digestibilidad *in vitro* de la MS con Viscozyme (vMS123vi), por países.

País.	n	y	x	a	b	R ²	drs	p
España	27	dMS	vMS123vi	5,49 (±5,02) p=0,2846	0,86 (±0,08)	0,84	1,45	0,0001
Bélgica	34	dMS	vMS123vi	-9,54 (±4,75) p=0,0531	1,06 (±0,07)	0,87	1,94	0,0001
Francia	19	dMS	vMS123vi	8,74 (±6,72) p=0,2106	0,81(±0,09)	0,82	2,06	0,0001
Italia	17	dMS	vMS123vi	-25,73 (±12,24) p=0,0529	1,33 (±0,18)	0,78	1,75	0,0001
Portugal	22	dMS	vMS123vi	21,2 (±14,4) p=0,1565	0,65 (±0,22)	0,31	2,4	0,0075
Global	119	dMS	vMS123vi	1,2 (±3,15) p=0,7027	0,92 (±0,05)	0,77	2,27	0,0001

Modelo: $y=a + b * x$

La recta obtenida con los datos de Bélgica aunque presenta una varianza residual no significativamente distinta de la de la recta obtenida con los datos de España, sí tiene una pendiente significativamente distinta (1-p=0,0054).

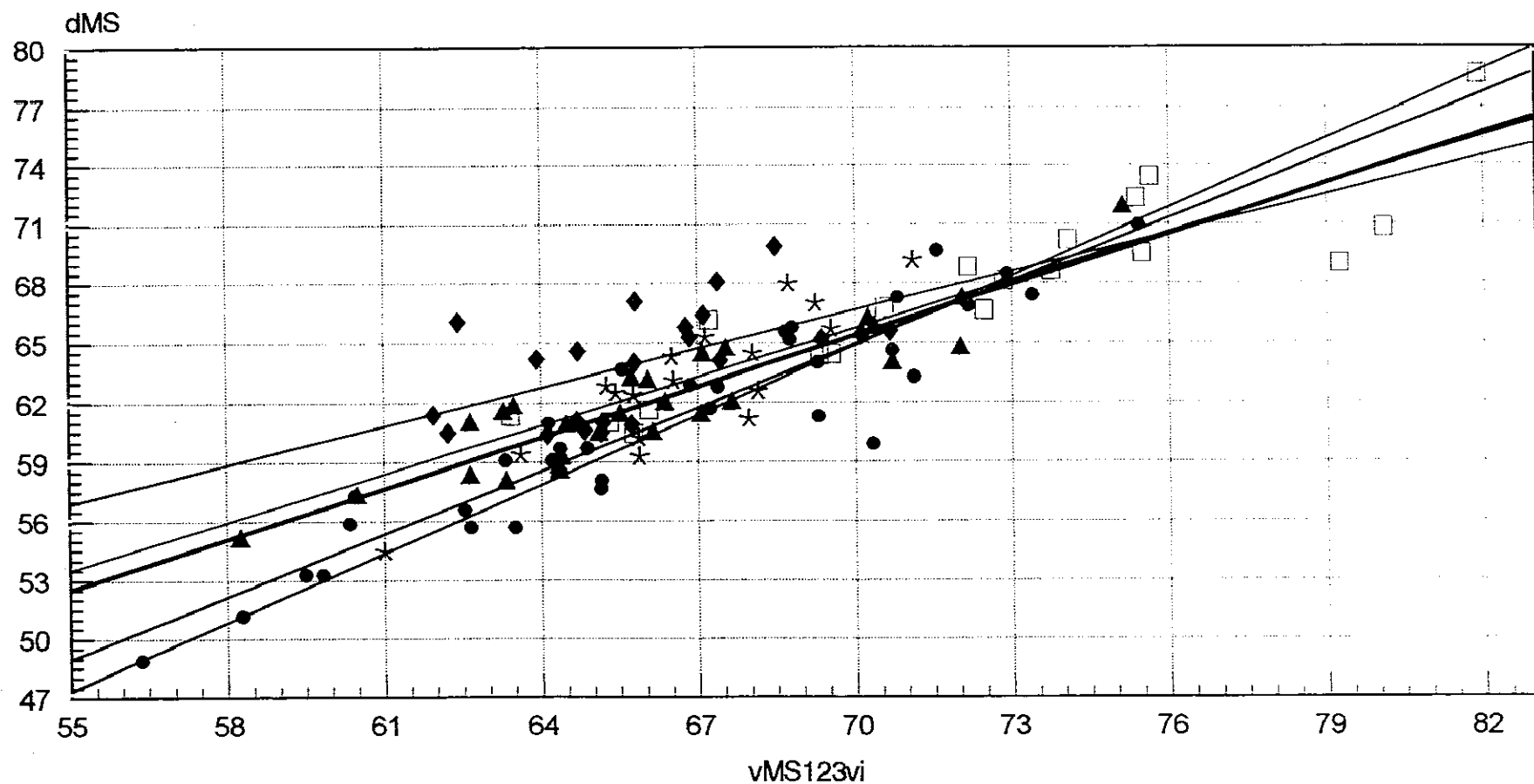
La recta obtenida con los datos de Francia no difiere significativamente ni en su varianza residual ni en su pendiente de la recta de España. (1-p=0,77).

La recta obtenida con los datos de Italia no presenta una varianza residual significativamente distinta de la de la recta de España, pero sus pendientes sí lo son (1-p=0,042).

Por último, la recta obtenida con los datos de Portugal presenta una varianza residual significativamente distinta de la recta de España, y por, tanto, también difieren sus pendientes (1-p=0,017).

Estos resultados confirman, además, lo ya observado en la representación gráfica de las desviaciones de los valores predichos de los observados (**Figura 7 b**).

Figura 8. Ajustes de dMS / vMS123vi por países



● BÉLGICA (n=34) ++ FRANCIA (n=19) ★ ITALIA (n=17) ◆ PORTUGAL (n=22) ▲ ESPAÑA (n=27)

IV.6.2. Validación con datos independientes.

Los resultados de la validación con datos independientes de las principales ecuaciones obtenidas en esta tesis figuran en la **Tabla 19**.

Todas las ecuaciones que se han validado son ecuaciones de predicción según la digestibilidad *in vitro* de la MS con tres pasos y Viscozyme en el tercer paso. Se han validado 5 ecuaciones: las 2 ecuaciones de predicción de dMS obtenidas bien con 27 ó con 41 datos, por ser las mejores ecuaciones obtenidas; la ecuación de predicción de dEB obtenida con 27 datos, aunque, recordemos que ésta presenta un R^2 y un drs peores que las dos anteriores; y finalmente, la predicción de la dEB en dos pasos sucesivos: obteniendo primero los valores de dMS predichos bien según la ecuación de predicción con 27 datos o según la ecuación con 41 datos, y a continuación obteniendo los valores de dEB predichos según la ecuación que relaciona la dEB con la dMS de los 27 datos, que es la siguiente:

$$dEB = 7,55 + 0,88 \text{ dMS} \quad R^2 = 0,89^{***} \quad drs = 1,20 \quad n=27$$

Se han utilizado 4 conjuntos de datos independientes para la validación: piensos procedentes de Bélgica, de Francia, de Italia y de Portugal. También se ha considerado el conjunto formado por la suma de todos ellos.

Como se puede apreciar en la **Tabla 19**, las 5 ecuaciones presentan errores de predicción muy bajos, menores del 10% de la dMS ó dEB media, en los 4 conjuntos de datos independientes así como en el conjunto de todos en global. Esto indica, según el criterio de Fuentes-Pila *et al.* (1995), que la capacidad de predicción de todas ellas es satisfactoria, tratándose, por tanto, de ecuaciones muy robustas. No obstante, a la vista de estos resultados, se podría adoptar un criterio propio, y considerar satisfactorios, por ejemplo, los errores menores de $\pm 5\%$; aceptables los que estuvieran comprendidos entre ± 5 y $\pm 10\%$ e insatisfactorios los que sobrepasaran el $\pm 10\%$. Incluso en el caso de hacerlo así, los resultados obtenidos indican que la capacidad predictora de las ecuaciones validadas es satisfactoria en todos los conjuntos de datos

independientes, indicando nuevamente una gran robustez de estas ecuaciones (sólomente hay un caso en que se sobrepasa el $\pm 5\%$ de error, pero muy ligeramente: $\pm 5,12\%$).

Tabla 19. Validación de las ecuaciones de predicción de dMS y dEB obtenidas utilizando la técnica de digestibilidad *in vitro* propuesta.

Datos independientes	Ecuación nº	Precisión de la predicción			
		ECM	\sqrt{ECM}	\bar{y}_{obs}	Error
Bélgica (n=34)	(1)	5,98	$\pm 2,44$	60,99	$\pm 4,01$
	(21)	5,51	$\pm 2,35$	60,99	$\pm 3,85$
	dMSdEB/vMS123vi (n=27)	8,68	$\pm 2,95$	60,36	$\pm 4,88$
	dMSdEB/vMS123vi (n=41)	8,08	$\pm 2,84$	60,36	$\pm 4,71$
	(2)	8,15	$\pm 2,85$	60,36	$\pm 4,73$
Francia (n=19)	(1)	3,92	$\pm 1,98$	67,46	$\pm 2,93$
	(21)	4,01	$\pm 2,00$	67,46	$\pm 2,97$
	dMSdEB/vMS123vi (n=27)*	6,31	$\pm 2,51$	66,02	$\pm 3,80$
	dMSdEB/vMS123vi (n=41)*	6,11	$\pm 2,47$	66,02	$\pm 3,74$
	(2)	5,97	$\pm 2,44$	66,02	$\pm 3,70$
Italia (n=17)	(1)	4,09	$\pm 2,02$	63,05	$\pm 3,21$
	(21)	4,21	$\pm 2,05$	63,05	$\pm 3,25$
	dMSdEB/vMS123vi (n=27)	4,12	$\pm 2,03$	62,33	$\pm 3,26$
	dMSdEB/vMS123vi (n=41)	4,07	$\pm 2,03$	62,33	$\pm 3,24$
	(2)	4,76	$\pm 2,18$	62,33	$\pm 3,50$
Portugal (n=22)**	(1)	9,95	$\pm 3,15$	64,01	$\pm 4,93$
	(21)	10,74	$\pm 3,28$	64,01	$\pm 5,12$
B+F+I+P (n=92)	(1)	6,15	$\pm 2,48$	63,43	$\pm 3,91$
	(21)	6,21	$\pm 2,49$	63,43	$\pm 3,93$
B+F+I (n=66)	dMSdEB/vMS123vi (n=27)	6,97	$\pm 2,64$	62,15	$\pm 4,25$
	dMSdEB/vMS123vi (n=41)	6,60	$\pm 2,57$	62,15	$\pm 4,13$
	(2)	6,78	$\pm 2,60$	62,15	$\pm 4,19$

ECM (%): Error cuadrático medio; \bar{y}_{obs} (%): variable dependiente observada (dMS ó dEB), media del conjunto de datos; Error (%): error de predicción, definido como $\sqrt{ECM} / \bar{y}_{obs} \times 100$.

*n = 15 **: no se dispone de los datos de dEB de los piensos de Portugal.

B: Bélgica; F: Francia; I: Italia; P: Portugal.

Se han validado también algunas de las principales ecuaciones de predicción de dEB con parámetros químicos de la pared celular (FAD ó FB), de uso común en la práctica. Estas ecuaciones están recopiladas en la Tabla 4 de la Revisión bibliográfica. Los resultados de esta validación se recogen en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Validación de las principales ecuaciones de predicción de dEB según parámetros químicos, utilizadas en la práctica.

Datos independientes	Referencia	n	x	Precisión de la predicción			
				ECM	\sqrt{ECM}	dEB_{obs}	Error
Bélgica (n=34)	Battaglini y Grandi (1984)	29	FAD	7,62	$\pm 2,76$	60,36	$\pm 4,57$
	Battaglini y Grandi (1984)	29	FB	6,70	$\pm 2,59$	60,36	$\pm 4,29$
	Ortiz y De Blas (1989)	175	FAD	9,98	$\pm 3,16$	60,36	$\pm 5,23$
	Ortiz y De Blas (1989)	219	FB	7,20	$\pm 2,68$	60,36	$\pm 4,45$
	De Blas <i>et al.</i> (1992)	66	FAD	9,54	$\pm 3,09$	60,36	$\pm 5,12$
	De Blas <i>et al.</i> (1992)	93	FAD	7,75	$\pm 2,78$	60,36	$\pm 4,61$
Francia (n=15)	Battaglini y Grandi (1984)	29	FAD	13,03	$\pm 3,61$	66,02	$\pm 5,47$
	Battaglini y Grandi (1984)	29	FB	48,28	$\pm 6,95$	66,02	$\pm 10,52$
	Ortiz y De Blas (1989)	175	FAD	11,15	$\pm 3,34$	66,02	$\pm 5,06$
	Ortiz y De Blas (1989)	219	FB	35,62	$\pm 5,97$	66,02	$\pm 9,04$
	De Blas <i>et al.</i> (1992)	66	FAD	10,87	$\pm 3,30$	66,02	$\pm 4,99$
	De Blas <i>et al.</i> (1992)	93	FAD	12,67	$\pm 3,56$	66,02	$\pm 5,39$
Italia (n=19)	Battaglini y Grandi (1984)	29	FAD	10,18	$\pm 3,19$	62,33	$\pm 5,12$
	Battaglini y Grandi (1984)	29	FB	9,14	$\pm 3,02$	62,33	$\pm 4,85$
	Ortiz y De Blas (1989)	175	FAD	9,59	$\pm 3,10$	62,33	$\pm 4,97$
	Ortiz y De Blas (1989)	219	FB	6,11	$\pm 2,47$	62,33	$\pm 3,97$
	De Blas <i>et al.</i> (1992)	66	FAD	9,67	$\pm 3,11$	62,33	$\pm 4,99$
	De Blas <i>et al.</i> (1992)	93	FAD	10,15	$\pm 3,19$	62,33	$\pm 5,11$
B+F+I (n=66)	Battaglini y Grandi (1984)	29	FAD	9,51	$\pm 3,08$	62,15	$\pm 4,96$
	Battaglini y Grandi (1984)	29	FB	16,78	$\pm 4,10$	62,15	$\pm 6,59$
	Ortiz y De Blas (1989)	175	FAD	10,14	$\pm 3,19$	62,15	$\pm 5,12$
	Ortiz y De Blas (1989)	219	FB	13,38	$\pm 3,66$	62,15	$\pm 5,89$
	De Blas <i>et al.</i> (1992)	66	FAD	9,88	$\pm 3,14$	62,15	$\pm 5,06$
	De Blas <i>et al.</i> (1992)	93	FAD	9,48	$\pm 3,08$	62,15	$\pm 4,95$

ECM(%): Error cuadrático medio; $dEB_{obs}(\%)$: digestibilidad de la EB observada, media del conjunto de datos; Error (%): error de predicción, definido como $\sqrt{ECM/dEB_{obs}} \times 100$.

En este caso se dispone solamente de 3 conjuntos de datos independientes, ya que de los piensos procedentes de Portugal no se disponía de los datos de dEB.

En general, las ecuaciones presentan errores de predicción menores del 10% de la dEB media, en los 3 conjuntos de datos independientes, así como en el conjunto

global. Se puede concluir, por tanto, que estas ecuaciones son capaces de predecir la dEB de piensos para conejos de un modo satisfactorio. Sólomente en un caso se sobrepasa muy ligeramente este valor, $\pm 10,52\%$ en uno de los conjuntos de datos independientes (Francia). En este caso la precisión de la predicción no se considera satisfactoria sino sólomente aceptable. La ecuación correspondiente, cuya precisión es satisfactoria en 2 de los 3 conjuntos de datos independientes, y aceptable en en tercero, se puede considerar ligeramente menos robusta que las ecuaciones que presentan predicción satisfactoria en los 3 conjuntos de datos independientes. Así, la ecuación de Battaglini y Grandi (1984) con FB ha resultado ser ligeramente menos robusta que el resto.

Si se adopta el criterio más restrictivo, ya comentado, los resultados obtenidos indican una mayor robustez de las ecuaciones de Ortiz y De Blas (1989), con FB y De Blas *et al.* (1992), con 66 datos, que las otras 4 ecuaciones; ya que muestran errores de predicción satisfactorios en 2 de los 3 conjuntos de datos independientes y aceptables en el tercero. Las ecuaciones de Battaglini y Grandi (1984), con FAD, Ortiz y De Blas (1989), con FAD, y De Blas *et al.* (1992), con 93 datos, presentan errores de predicción satisfactorios en sólo 1 de los 3 conjuntos de datos independientes, y aceptables en los otros 2, por lo que también son robustas pero no tanto como las anteriores. Finalmente, la ecuación de Battaglini y Grandi (1984), con FB, que es satisfactoria en 2 de los 3 conjuntos, pero insatisfactoria en el tercero, es la menos robusta de las 6. Además, ante el conjunto de los datos de los 3 países juntos, todas las ecuaciones presentan un error satisfactorio o aceptable.

A la luz de estos resultados, se puede considerar que las ecuaciones de predicción de dMS y de dEB según la digestibilidad de la MS obtenida según el método de digestión *in vitro* propuesto en esta tesis, han demostrado ser válidas para predecir piensos de conejos. Estas ecuaciones son, además, tan robustas o más que las ecuaciones de predicción basadas en parámetros químicos ya existentes en la bibliografía. Por consiguiente, se pueden añadir a éstas y así constituir una opción

más a la hora de elegir una ecuación para predecir el valor nutritivo de un pienso para conejos.

La robustez de los modelos de predicción, en general, es un parámetro que no se evalúa normalmente; y más concretamente, la predicción del valor energético de alimentos para conejos no ha sido probada con anterioridad. En rumiantes, sin embargo, algunos trabajos ya lo ponen en práctica. Así Fuentes-Pila *et al.* (1995), basándose en algunos trabajos recientes, evalúan la capacidad predictora de 7 ecuaciones de predicción de la ingestión voluntaria diaria de MS, de vacas lecheras en producción, desarrolladas en U.S.A. Estas ecuaciones, que son de regresión múltiple y están basadas en 2 ó más parámetros productivos, las evalúan con 11 conjuntos de datos independientes. Los resultados que obtienen indican, en general poca robustez de las ecuaciones evaluadas, ya que la mayoría de los errores de predicción obtenidos son mayores de $\pm 10\%$, e incluso de $\pm 20\%$.

Teniendo, pues, en cuenta estos valores obtenidos en ecuaciones para rumiantes, los resultados de las ecuaciones para conejos validadas en nuestro trabajo indican que se dispone de ecuaciones de predicción muy robustas, basadas tanto en parámetros de pared celular como en valores de digestibilidad *in vitro*.

V. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta por un lado los objetivos y las hipótesis que se plantearon al inicio de esta tesis, y por otro los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- Se ha puesto en marcha un nuevo método para determinar la digestibilidad en el conejo, desarrollando las bases de una técnica de digestión enzimática *in vitro* para predecir el valor nutritivo de piensos compuestos destinados a esta especie. Tras comparar las predicciones obtenidas mediante cuatro técnicas distintas, la técnica finalmente propuesta se desarrolla en tres fases: las dos primeras tratan de reproducir la digestión pre-cecal, y consisten en dos incubaciones sucesivas con pepsina/HCl y con pancreatina; la tercera simula la fermentación cecal del conejo mediante una incubación con el preparado enzimático microbiano, Viscozyme. Se trata de una metodología de laboratorio sencilla que presenta buena repetibilidad y fiabilidad.

2.- Los valores de digestibilidad total *in vitro* obtenidos son siempre más elevados que sus correspondientes valores de digestibilidad total *in vivo*, para todos los nutrientes estudiados (MS, MO, FB y PB). En consecuencia, se puede decir que el método no consigue una simulación exacta de la digestión del conejo.

3.- Los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS y de la MO están altamente correlacionados con sus correspondientes valores obtenidos mediante pruebas de digestibilidad *in vivo*. Por consiguiente, con este método *in vitro* se puede predecir de una forma precisa la digestibilidad de la MS, de la MO, de la EB y la ED de los piensos de conejos. Sin embargo, el método *in vitro* propuesto no sirve para predecir la digestibilidad de la PB y de la FB de los piensos de conejos, pues las correlaciones obtenidas son muy bajas y poco precisas.

4.- Los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS obtenidos mediante la técnica propuesta son mejores predictores del valor nutritivo que los parámetros de fibra de la

pared celular (FAD y FB), siendo además, más repetibles y fiables. No obstante, estos parámetros químicos contribuyen a explicar un cierto porcentaje más de la variación total ya explicada por la variable digestibilidad *in vitro*.

5.- Mediante esta técnica es posible predecir el valor nutritivo de algunos tipos de alimentos -fibras altamente digestibles, grasas- cuya predicción no consiguen los parámetros químicos.

6.- Las ecuaciones de predicción de la dMS y de la dEB según los valores de digestibilidad *in vitro* de la MS, obtenidos según el método de digestibilidad *in vitro* propuesto en esta tesis, se muestran robustas en la validación con datos independientes. En consecuencia se puede recomendar su uso para realizar predicciones en la práctica. Estas ecuaciones son, además, tan robustas o más que las ecuaciones de predicción basadas en parámetros químicos ya existentes en la bibliografía. Por consiguiente, se pueden añadir a éstas y así constituir una opción más a la hora de elegir una ecuación para predecir el valor nutritivo de un pienso para conejos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ADERIBIGBE,A.O. y CHEEKE,P.R. (1992). *In vitro* rabbit cecal digestibility: effect of copper sulfate and donor age. *Journal of Applied Rabbit Research*,**15**: 1235-1240.
- ADERIBIGBE,A.O. y CHEEKE,P.R. (1993). Comparison of *in vitro* digestion of feed ingredients by rabbit cecal and bovine rumen fluids. *Animal Feed Science and Technology*,**41**: 329-339.
- ALDERMAN,G. (1985). Prediction of the energy value of compound feeds. En: **Recent Advances in Animal Nutrition**. Ed. Butterworths (W. Haresing y D.J.A. Cole, editors).
- ALUS,G. y EDWARDS,N.A. (1976). Development of the digestive tract of the rabbit from birth to weaning. *Proceedings of the Nutrition Society*,**36**: 3A.
- ASP,N.G.; JOHANSSON,C.G.; HALLMER,H. y SILJESTRÖM,M. (1983). Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,**31**: 476-482.
- AUFRÈRE,J. (1982). Étude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. *Annales de Zootechnie*,**31** (2): 111-130.
- AUFRÈRE,J. y MICHALET-DOREAU,B. (1988). Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. *Animal Feed Science and Technology*,**20**: 203-218.
- AUVERGNE,A.; BOUYSSOU,T.; PAIRET,M.; BOUILLIER-LOUDOT,M.; RUCKEBUSCH,Y. y CANDAU,M. (1987). Nature de l'aliment, finesse de mouture et données anatomofonctionnelles du tube digestif proximal du lapin. *Reproduction, Nutrition, Développement*, **27** (4): 755.
- BABINSZKY,L.; VAN DER MEER,J.M.; BOER,H. y den HARTOG,L.A. (1990). An *in vitro* method for prediction of the digestible crude protein content in pig feeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,**50**: 173-178.
- BAILEY, S. y HENDERSON,K.. (1990). Consequences of inter-laboratory variation in chemical analysis. En: **Feedstuff Evaluation**, pp.353-363. (J. Wiseman y D.J.A. Cole, editors). Ed. Butterworths.
- BATTAGLINI,M. y GRANDI,A. (1984). Stima del valore nutritivo dei mangini composti per conigli. Proc. III Congresso Mundial de Cunicultura. Roma. Vol I: 252-264.
- BATTAGLINI,M. y GRANDI,A. (1986). Stima del valore nutritivo dei mangini composti per conigli. *Coniglicoltura*,**23**(4): 51-53.

- BELLIER,R.; GIDENNE,T.; VERNAY,M. y COLIN,M. (1995). *In vivo* study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science*,**73**: 128-135.
- BJÖRNHAG,G. (1972). Separation and delay of contents in the rabbit colon. *Swedish Journal of Agricultural Research*,**2**: 125-136.
- BJÖRNHAG,G. (1981). Separation and retrograde transport in the large intestine of herbivores. *Livestock Production Science*,**8**: 351-360.
- BLAS,E. (1986). El almidón en la nutrición del conejo; utilización digestiva e implicaciones prácticas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. 227pp.
- BLAS,E. ; FANDOS,J.C. ; CERVERA,C. ; GIDENNE,T. y PÉREZ,J.M. (1990). Effet de la nature et du taux d'amidon sur l'utilisation digestive de la ration chez le lapin, au cours de la croissance. 5^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole. Paris.
- BOISEN,S. y FERNÁNDEZ,J.M. (1991a). *In vitro* digestibility of energy and amino acids in pig feeds. En: **Digestive Physiology in Pigs**, pp.231-236. (M.W.A. Verstegen, J. Huisman y L.A. den Hartog, editors). Wageningen. Puduc.
- BOISEN,S. y FERNÁNDEZ,J.M. (1991b). *In vitro* digestion as a basis for the prediction of energy and protein value in pig feeds. 42nd Annual Meeting of the European Association of Animal Production. Berlin. Report (8pp) presented at meeting September 1991.
- BOISEN,S. y FERNÁNDEZ,J.M. (1993). *In vitro* technique. Advantages and limitations of its application in feed evaluation for pig production. 44th Annual Meeting of the European Association of Animal Production. Aarhus (Denmark). Report (11pp) presented at meeting August 1993.
- BOISEN,S. y FERNÁNDEZ,J.M. (1995). Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by *in vitro* analyses. *Animal Feed Science and Technology*,**51**: 29-43.
- BONNAFOUS,R. y RAYNAUD,P. (1970). Recherches sur les variations de la densité des microorganismes dans le colon du lapin domestique. *Experientia*,**26**: 52-53.
- BOUYSSOU,T.; CANDAU,M. y RUCKEBUSCH,Y. (1988). Réponses motrices du côlon aux constituants pariétaux et à la finesse de mouture des aliments chez le lapin. *Reproduction, Nutrition, Développement*,**28**: 181-182.

- BÜCHMANN,N.B. (1979). *In vitro* digestibility of protein from barley and other cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,**30**: 583-589.
- BUTTS,C.A.; MOUGHAN,P.J.; SMITH,W.C.; REYNOLDS,G.W. y GARRICK,D.J. (1993). The effect of food dry matter intake on endogenous ileal amino acid excretion determined under peptide alimentation in the 50 Kg liveweight pig. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,**62**: 235-243.
- CAMUS,M.C. y LAPORTE,J.C. (1980). Protéolyse *in vitro* de caséine et de gluten par les enzymes pancréatiques. *Reproduction, Nutrition, Développement*,**20 (4A)**:1025-1039.
- CARABAÑO,R. ; FRAGA,M.J. ; SANTOMÁ,G. y DE BLAS,J. C. (1988). Effect of diet on composition of cecal contents and on excretion and composition of soft and hard feces. *Journal of Animal Science*,**66**: 901-910.
- CARABAÑO,R. ; FRAGA,M.J. y DE BLAS,J. C. (1989). Effect of protein source in fibrous diets on performance and digestive parameters of fattening rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research*,**12(3)**: 201-204.
- CHAMPE,K. A. y MAURICE,D.V. (1983). Response of early weaned rabbits to source and level of dietary fiber. *Journal of Animal Science*,**56(5)**: 1105-1114.
- CHEEKE,P.R. (1987). Rabbit Feeding and Nutrition. A series of monographs. Ed. Academic Press. Inc. Orlando, U.S.A.
- CHEEKE,P.R. y PATTON,N.M. (1980). Carbohydrate overload of the hindgut: A probable cause of enteritis. *Journal of Applied Rabbit Research*,**3(3)**: 20-23.
- CLUNIES,M. y LEESON,S. (1984). *In vitro* estimation of dry matter and crude protein digestibility. *Poultry Science*,**63**: 89-96.
- CONE,J.W. y VAN DER POEL, A.F.B. (1993). Prediction of apparent ileal protein digestibility in pigs with a two-step *in-vitro* method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,**62**: 393-400.
- COPPOLA,S. ; PERCUECO,G. y PROTO,V. (1973). Some aspects of metabolism of the microflora of the caecum on protein nutrition on the rabbit. *Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale*,**49**: 1253-1259.
- CORINO,C. (1987). Some considerations about the nutritive value evaluation of concentrates for rabbits *Coniglicoltura*,**24(9)**: 41-44.

- CORRING,T. ; LEBAS,F. y COURTOT,D. (1972). Contrôle de l'évolution de l'équipement enzymatique du pancréas exocrine du lapin de la naissance a 6 semaines. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*,12(2): 221-231.
- DE BLAS,J.C.; RODRIGUEZ,J.M.; SANTOMÁ,G. y FRAGA,M.J. (1984a). The nutritive value of feeds for growing fattening rabbits. 1. Energy evaluation. *Journal of Applied Rabbit Research*,7(2): 72-74.
- DE BLAS,J.C; FRAGA,M.J.; RODRIGUEZ,J.M. y MENDEZ,J. (1984b). The nutritive value of feeds for growing fattening rabbits. 2. Protein evaluation. *Journal of Applied Rabbit Research*,7(3): 97-100.
- DE BLAS,J.C.; SANTOMÁ,G.; CARABAÑO,R. y FRAGA,M.J. (1986). Fiber and starch levels in fattening rabbit diets. *Journal of Animal Science*, 63: 1897-1904.
- DE BLAS,J.C.; WISEMAN,J.; FRAGA,M.J. y VILLAMIDE,M.J. (1992). Prediction of the digestible energy and digestibility of gross energy of feeds for rabbits. 2. Mixed diets. *Animal Feed Science and Technology*,39: 39-52.
- DE LANGE,C.F.M; SAUER,W.C.; MOSENTHIN,R. y SOUFFRANT,W.B. (1989a). The effect of feeding different protein-free diets on the recovery and amino acid composition of endogenous protein collected from the distal ileum and feces in pigs. *Journal of Animal Science*, 67: 746-754.
- DE LANGE,C.F.M; SAUER,W.C. y SOUFFRANT,W.B. (1989b). The effect of protein status of the pig on the recovery and amino acid composition of endogenous protein in digesta collected from the distal ileum. *Journal of Animal Science*, 67: 755-762.
- DE LANGE,C.F.M.; SOUFFRANT,W.B. y SAUER,W.C. (1990). Real ileal protein and amino acid digestibilities in feedstuffs for growing pigs as determined with the ¹⁵N-isotope dilution technique. *Journal of Animal Science*,68: 409-418.
- DIERICK,,N.; VERVAEKE,I.;DECUYPERE,J. y HENDRICKX,H. (1985). Protein digestion in pigs measured *in vivo* and *in vitro*. En **Digestive Physiology in the Pig**. pp. 329-332 [A.Just, H. Jørgensen y J.A. Fernández, editors]. Copenhagen: National Institute of Animal Science.
- DOWMAN,M.G. y COLLINS,F.C. (1982). The use of enzymes to predict the digestibility of animal feeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,33: 689-696.
- DROCHNER,W. (1984). The influence of changing amounts of crude fiber and pectic components on pre-cecal and post-ileal digestive processes in the growing pig. *Supplement to Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*,17:82pp.

- EHLE, F.R.; JERACI, J.L.; ROBERTSON, J.B. y VAN SOEST, P.J. (1982). The influence of dietary fiber on digestibility, rate of passage and gastrointestinal fermentation in pigs. *Journal of Animal Science*, **55**: 1071-1081.
- EMALDI, O.; CROCIANI, F.; MATTEUZI, D. y PROTO, V. (1979). A note on the total viable counts and selective enumeration of anaerobic bacteria in the caecal content, soft and hard faeces of rabbit. *Journal of Applied Bacteriology*, **46**: 169-172.
- ESCALONA, B.; ROCHA, R.; GARCÍA, J.; CARABAÑO, R. y DE BLAS, C. (1995). Efecto del tipo de fibra sobre la extensión y velocidad de digestión de la fibra neutro-detergente. VI Jornadas sobre Producción Animal. ITEA. Zaragoza. Volumen extra, nº 16, tomo I: 45-47.
- FALCÃO e CUNHA, L. (1988). Os constituintes da parede celular no processo digestivo do coelho. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. Tesis doctoral. 359pp.
- FEDII, E.M.; TROTSSENKO, B.L.; DEREVYANKO, I.D. y SUKHANOVA, V.V. (1982). Effect of fiber on activity of digestive enzymes in rabbits. *Nutrition Abstracts and Reviews-B*, **52**(1182): 141.
- FEKETE, S. y BOKORI, J. (1985). The effect of the fiber and protein level of the ration upon the cecotrophy of rabbit. *Journal of Applied Rabbit Research*, **8**: 68-71.
- FEKETE, S. y GIPPERT, T. (1986). Digestibility and nutritive value of nineteen important feedstuffs for rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research*, **9**(3): 103-108.
- FERNÁNDEZ, C. ; FRAGA, M.J. y CARABAÑO, R. (1991). The effect of source and inclusion level of fats on rabbit digestion. 42nd Annual Meeting of the E.A.A.P. Berlín. Vol I.
- FERNÁNDEZ, C. ; COBOS, A. y FRAGA, M.J. (1994). The effect of fat inclusion on diet digestibility in growing rabbits. *Journal of Animal Science*, **72**: 1508-1515.
- FIORAMONTI, J. y RUCKEBUSCH, Y. (1976). La motricité caecale chez le lapin. III. Dualité de l'excrétion fécale. *Annales de Recherche Vétérinaire*, **7**(3): 281-295.
- FIORAMONTI, J. ; BUENO, L. y CANDAU, M. (1979). Gastro-intestinal motility as affected by the dietary cell wall constituents (carbohydrates) in the rabbit. *Annales de Zootechnie*, **28**(1): 127.
- FONTY, G. y GOUET, Ph. (1989). Fibre degrading microorganisms in the monogastric digestive tract. *Animal Feed Science and Technology*, **23**: 91-107.

- FONTY,G.; GOUET,Ph. y RIOU,Y. (1979). Effect of milk composition on the gastro-intestinal microflora of artificially reared young rabbit. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*,**19**: 567-571.
- FRAGA,M.J. y DE BLAS,J.C. (1977). Influencia de la coprofagia sobre la utilización digestiva de los alimentos por el conejo. *Annales INIA. Servicio de Producción Animal*,**8**: 43-47.
- FRAGA,M.J.; BARRENO,C.; CARABAÑO,R.; MÉNDEZ,J. y DE BLAS,J.C. (1984). Efecto de los niveles de fibra y proteína del pienso sobre la velocidad de crecimiento y los parámetros digestivos de los conejos. *Annales INIA. Servicio de Producción Animal*,**21**: 91-110.
- FRAGA,M.J. ; PÉREZ de AYALA,P. ; CARABAÑO,R. y DE BLAS,J.C. (1991). Effect of type of fiber on the rate of passage and on the contribution of soft feces to nutrient intake of finishing rabbits. *Journal of Animal Science*,**69**: 1566-1574.
- FUENTES-PILA,J.; DELORENZO,M.A.; BEEDE,D.K.; STAPLES,C.R. y HOLTER,J.B. (1995). Evaluation of equations based on animal factors for predicting intake of lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. (enviado a publicar).
- FURUYA,S. y KAJI, Y. (1992). The effect of feed intake and purified cellulose on the endogenous ileal amino acid flow in growing pigs. *British Journal of Nutrition*,**68**: 463.
- FURUYA,S.; SAKAMOTO,K. y TAKAHASHI,S. (1979). A new *in vitro* method for the estimation of digestibility using the intestinal fluid of the pig. *British Journal of Nutrition*,**41**: 511-520.
- GALLOUIN,F. (1983). Le comportement de caecotrophie chez le lapin. *Cuni Sciences*, **1**(2): 1-23.
- GARCÍA,G.; GÁLVEZ,J.F. y DE BLAS, J.C. (1993). Effect of substitution of sugar beet pulp for barley in diets for finishing rabbits on growth performance and on energy and nitrogen efficiency. *Journal of Animal Science*,**71**: 1823-1830.
- GARCÍA,J.;DE BLAS,C.; CARABAÑO,R. y GARCÍA,P. (1994). Effect of chemical composition of alfalfa hay on several digestive measurements in growing rabbits. Cahiers OPTIONS Méditerranéennes. Vol 8. Rabbit Production in Hot Climates. CIHEAM/ERSA.
- GARCÍA,J.; CARABAÑO,R. y DE BLAS;C. (1995). Efecto del tipo de fibra sobre la digestión en conejos. VI Jornadas sobre Producción Animal. ITEA. Zaragoza.
- GAUTHIER,S.F., VACHON,C. y SAVOIE, L. (1986). Enzymatic conditions of an *in vitro* method to study protein digestion. *Journal of Food Science*, **51**(4): 960-964.

- GIDENNE, T. (1987). Influence de la teneur en lignines des aliments sur la composition des digesta et la production de caecotrophes chez le lapereau. *Annales de Zootechnie*, **36**(1): 85-90.
- GIDENNE, T. (1992). Effect of fiber level, particle size and adaptation period on digestibility and rate of passage as measured at the ileum and in the faeces in the adult rabbit. *British Journal of Nutrition*, **67**: 133-146.
- GIDENNE, T. (1993). Measurement of the rate of passage in restricted-fed rabbits: effect of dietary cell wall level on the transit of fibre particles of different sizes. *Animal Feed Science and Technology*, **42**: 151-153.
- GIDENNE, T. (1994). Effets d'une réduction de la teneur en fibres alimentaires sur le transit digestif du lapin. Comparaison et validation de modèles d'ajustement des cinétiques d'excretion fécale des marqueurs. *Reproduction, Nutrition, Développement*, **34**: 295-306.
- GIDENNE, T. y LEBAS, F. (1984). Evolution circadienne du contenu digestif chez le lapin en croissance. Relation avec la caecotrophie. Proc. III Congreso Mundial de Cunicultura. Roma. Vol. II: 494-501.
- GIDENNE, T. y LEBAS, F. (1987). Estimation quantitative de la caecotrophie chez le lapin en croissance. Variations en fonction de l'âge. *Annales de Zootechnie*, **36**(3): 225-336.
- GIDENNE, T. y PÉREZ, J.M. (1993). Effect of dietary starch origin on digestion in the rabbit. 2. Starch hydrolysis in the small intestine, cell wall degradation and rate of passage measurements. *Animal Feed Science and Technology*, **42**: 249-257.
- GIDENNE, T. y PONCET, C. (1985). Digestion, chez le lapin en croissance, d'une ration à taux élevé de constituants pariétaux: étude méthodologique pour le calcul de digestibilité apparente, par segment digestif. *Annales de Zootechnie*, **34**(4): 429-445.
- GIDENNE, T. y RUCKEBUSCH, Y. (1989). Flow and passage rate studies at the ileal level in the rabbit. *Reproduction, Nutrition, Développement*, **29**: 403-412.
- GIDENNE, T. , PONCET, C. y GÓMEZ, L. (1987). Effet de l'addition d'un concentré riche en fibres dans une ration à base de foin, distribuée à deux niveaux alimentaires chez la lapine adulte. 1. Temps de séjour moyen des aliments. *Reproduction, Nutrition, Développement*, **27**(3): 733-743.
- GIDENNE, T. ; PÉREZ, J.M. ; VIUDES, P. y BLAS, E. (1990). Utilisation digestive de la ration chez le lapin au cours de la croissance: effet de la nature d'amidon. Communication à la 41^{ème} Réunion Annuelle de la Fédération Européenne de Zootechnie. Toulouse.

- GIDENNE,T.; CARRÉ,B.; SEGURA,M.; LAPANOUSE,A. y GOMEZ,J. (1991). Fibre digestion and rate of passage in the rabbit: effect of particle size and level of lucerne meal. *Animal Feed Science and Technology*,**32**: 215-221.
- GIVENS,D.I.; EVERINGTON,J.M. y ADAMSON,A.H. (1989). Chemical composition, digestibility *in vitro*, and digestibility and energy value *in vivo* of untreated cereal straws produced on farms throughout England. *Animal Feed Science and Technology*,**26**: 323-335.
- GOUET,Ph y FONTY,G. (1979). Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*,**19**: 553-566.
- GRAHAM,H.; LÖWGREN,W. y ÅMAN,P. (1989). An *in vitro* method for studying digestion in the pig. 2. Comparison with *in vivo* ileal and faecal digestibilities. *British Journal of Nutrition*,**61**: 689-698.
- GRALAK,M.A.; CASTRO,T.; M.M.I. EL ALDAWY; SANZ-ARIAS,R. y BRANDAU,D. (1992). The influence of cecotomy on growth and digestibility in weaned rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research*,**15**: 1183-1188.
- GRIFFITHS,M. y DAVIES,D. (1963). The role of the soft pellets in the production of lactic acid in the rabbit stomach. *Journal of Nutrition*,**80**: 171-180.
- HOOVER,W.M. y HEITMAN,R.N. (1972). Effects of dietary fiber levels on weight gain, cecal volume and volatile fatty acid production in rabbits. *Journal of Nutrition*,**102**: 375-380.
- HÖRNICKE,H. (1981). Utilization of caecal digesta by caecotrophy (soft faeces ingestion) in the rabbit. *Livestock Production Science*,**8**: 361-366.
- HUNGATE,R.E. (1984). Microbes of nutritional importance in the alimentary tract. *Proceedings of the Nutrition Society*,**43**: 1-11.
- INTERNATIONAL STANDARDS ORGANISATION (1986). Precision of test methods. Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests. ISO 5725. Génova. Suiza. Disponible a través de British Standards, Linford Wood, Milton Keynes MK14 6LE, UK y otras organizaciones estándares nacionales.
- JILGE,B. (1974). Soft faeces excretion and passage time in the laboratory rabbit. *Laboratory Animals*,**8**: 337-346.

JILGE,B. (1982). Monophasic and diphasic patterns of the circadian caecotrophy rhythm of rabbits. *Laboratory Animals*,**16**(1): 1-6.

KENNEDY,L.G. y HERSHBERGER,T.V. (1974). Protein quality for the non-ruminant herbivore. *Journal of Animal Science*,**39**(3): 506 -511.

KNUTSON,R.S.; FRANCIS,R.S.; HALL,J.R.; MOORE,B.H.O. y HEISINGER,J.F. (1977). Ammonia and urea distribution and urease activity in the gastrointestinal tract of rabbits. *Comparative Biochemistry and Physiology*,**58A**: 151-154.

LANG,J. (1981). The nutrition of the commercial rabbit. Part 1. Physiology, digestibility and nutrient requirements. *Nutrition Abstracts and Reviews-B*,**51**(4): 197-225.

LAPLACE,J.P. (1978). Le transit digestif chez les monogastriques. III.- Comportement (prise de nourriture-caecotrophie), motricité et transit digestifs, et pathogénie des diarrhées chez le lapin. *Annales de Zootechnie*,**27**(2): 225-265.

LAPLACE,J.P. y LEBAS,F. (1975). Le transit digestif chez le lapin. III.-Influence de l'heure et du mode d'administration sur l'excrétion fécale du cérium-141, chez le lapin alimenté *ad libitum*. *Annales de Zootechnie*,**24**(2): 255-265.

LAPLACE,J.P. y LEBAS,F. (1977). Le transit digestif chez le lapin. VII.- Influence de la finesse du broyage des constituants d'un aliment granulé. *Annales de Zootechnie*,**26**(3): 413-420.

LEBAS,F. (1979). La nutrition du lapin: mouvement des digesta et transit. *Cuniculture*,**6**: 67-68.

LEBAS,F. y LAPLACE,J.P. (1975). Le transit digestif chez le lapin. V. Evolution de l'excrétion fécale en fonction de l'heure de distribution de l'aliment et du niveau de rationnement durant les 5 jours qui suivent l'application de ce dernier. *Annales de Zootechnie*,**24**(4): 613-627.

LEBAS,F. y LAPLACE,J.P. (1977a). Le transit digestif chez le lapin. VIII - Influence de la source de cellulose. *Annales de Zootechnie*,**26**(4): 575-584.

LEBAS,F. y LAPLACE,J.P. (1977b). Growth and digestive transit in the rabbit. Variations determined by physical form, composition and crude fibre content of the feed. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*, **17**(4): 535-538.

LEBAS,F. y LAPLACE,J.P. (1977c). Le transit digestif chez le lapin. VI. Influence de la granulation des aliments. *Annales de Zootechnie*,**26**(1): 83-91.

LEBAS,F.; CORRING,T. y COURTOT,D. (1971). Equipement enzymatique du pancréas exocrine chez le lapin, mise en place et évolution de la naissance au sevrage. Relation avec la composition du régime alimentaire. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*,11(3): 399-413.

LEDIN,I. (1984). A note on the effect of different feeding levels on the rate of digesta passage in rabbits. *Acta Agriculture Scandinavia*,34: 67-70.

LEE,P.C.; BROOKS,S.P.; KIM,O.; HEITLINGER,L.A. y LEBENTHAL,E. (1985). Digestibility of native and modified starches: *In vitro* studies with human and rabbit pancreatic amylases and *in vivo* studies in rabbits. *Journal of Nutrition*,115: 93-103.

LEKULE,F.P.; JØRGENSEN,H.; FERNANDEZ,J.A. y JUST,A. (1990). Nutritive value of some tropical feedstuffs for pigs. Chemical composition, digestibility and metabolisable energy content. *Animal Feed Science and Technology*,28: 91-101.

LIVINGSTON,R.M.; BAIRD,B.A.; ATKINSON,T. y CROFTS,R.M.J. (1980). Circadian variation in the apparent digestibility of diets measured at the terminal ileum in pigs. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*,94: 399-405.

LLOPIS,A. y FERNÁNDEZ CARMONA,J. (1992). Un nuevo método *in vitro* para el estudio de la digestión en el conejo. Trabajo de fin de carrera. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia.

LORENTE,M.; FRAGA,M.J.; CARABAÑO,R. y DE BLAS,J.C. (1988). Coprophagy in lactating does fed different diets. *Journal of Applied Rabbit Research*,11(1): 11-15.

LOW,A.G. (1982). Endogenous nitrogen evaluation from absorption studies. En: **Physiologie digestive chez le porc** (Laplace,J.P.; Corring,T. y Rérat,A.,éditeurs). Colloques de l'INRA n° 12: 187-198.

LÖWGREN,W.; GRAHAM,H. y ÅMAN,P. (1989). An *in vitro* method for studying digestion in the pig. 1. Simulating digestion in the different compartments of the intestine. *British Journal of Nutrition*,61: 673-687.

LUICK,B.R.; AYERS,A. y CHEEKE,P.R. (1992). Rate of passage of black locust leaf and alfalfa meal in the rabbit gut. *Journal of Applied Rabbit Research*,15: 914-921.

MAERTENS,L. y DE GROOTE,G. (1982). Etude de la variabilité des coefficients de digestibilité des lapins suite aux différences d'âge, de sexe, de race et d'origine. *Revue de l'Agriculture* n° 4, vol. 35: 2787-2797.

MAERTENS,L. y DE GROOTE,G. (1984). Digestibility and digestible energy content of a number of feedstuffs for rabbits. Proc. III Congreso Mundial de Cunicultura. Roma. Vol I: 244-251.

MAERTENS,L.; MOERMANS,R. y DE GROOTE,G. (1988). Prediction of the apparent digestible energy content of commercial pelleted feeds for rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research*,11(2): 60-67.

MAERTENS,L.; JANSSEN,W.M.M.A.; STEENLAND,E.M.; WOLTERS,D.F.; BRANJE,H.E.B. y JAGER,F. (1990). Tables de composition, de digestibilité et de valeur énergétique des matières premières pour lapins. 5^{émes} Journées de la Recherche Cunicole. Paris. Ed. ITAVI. Com. n° 57.

MAKKAR,H.P.S. y SINGH,B. (1987). Comparative enzymatic profiles of rabbit cecum and bovine rumen contents. *Journal of Applied Rabbit Research*,10(4): 172-174.

MAROUNEK,M.; VOVK,S.J. y SKRIVANOVÁ,V. (1995). Distribution of activity of hidrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *British Journal of Nutrition*,73: 463-469.

MERINO,J.M. (1994). Puesta a punto de una técnica de canulación ileal en el conejo para el estudio del aprovechamiento de los nutrientes de la dieta. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 175pp.

MERINO,J.M. y CARABAÑO,R. (1992). Effect of type of fiber on ileal and faecal digestibilities. *Journal of Applied Rabbit Research*,15: 931-937.

METZ,S.H.M. y VAN DER MEER,J.M. (1985). Nylon bags and *in vitro* techniques to predict *in vivo* digestibility of organic matter in feedstuffs for pigs. En **Digestive Physiology in the Pig**, pp.373-376. (A. Just, H. Jorgensen y J.A: Fernández, editors). Copenhagen : National Institute of Animal Science.

MILLARD,P. y CHESSON,A. (1984). Modifications to swede (*Brassica napus* L.) anterior to the terminal ileum of pigs: some implications for the analysis of dietary fiber. *British Journal of Nutrition*,52: 583-594.

MONTGOMERY,D.C. y PECK,E.A. (1982). Validation of Regression Models. En: **Introduction to linear Regression Analysis**. (John Wiley & sons, editors). New York.

MORE,J.; BEAUVILLE,H. y VERNAY,M. (1971). Composition électrolytique du suc et étude histologique des poches fundiques à sécrétion neutre de l'estomac du lapin. *Annales des Recherches Vétérinaires*,2: 91-98.

MORISSE,J.P.; BOILLETOT,E. y MAURICE,R. (1985). Changes induced by feeding in intestinal environment of rabbits (VFA, NH₃, pH, Flora). *Journal of Applied Rabbit Research*,8(4): 183-184.

- MOTTA,W. (1990). Efectos de la sustitución parcial de heno de alfalfa por orujo de uva o pulpa de remolacha sobre la utilización de la dieta y los rendimientos productivos en conejos en crecimiento. Tesis Doctoral. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 251pp.
- MUÑOZ, F. (1991). CIHEAM Work Group: Nutritive Value of Feedstuffs and By-products of the Mediterranean Area. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires*,16: 27-34.
- MUÑOZ, F; ARGAMENTERIA, A. y ANDUEZA,D. (1994). Cadena de Análisis Interlaboratorial de Alimentos para el Ganado. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. 107 pp.
- NEFZAOU,A. y VANBELLE,M. (1984). Evaluation des méthodes *in vitro* pour prédire la valeur nutritive des résidus de récolte et des sous-produits agro-industriels des pays en voie de développement. Publication n° 37 du Laboratoire de Biochimie de la Nutrition. Faculte des Sciences Agronomiques. Louvain-la-Neuve. Belgique.
- ORTIZ,V. y DE BLAS,J.C. (1989). Predicción de la digestibilidad de la energía de los piensos para conejos a partir de su contenido en fibra. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animales*,4(3): 197-205.
- PAGANO TOSCANO,G.; BENATTI,G. y ZOCCARATO,I. (1984). Stima della digeribilità degli alimenti nei conigli. *Coniglicoltura*,21(10): 31-34.
- PAGANO TOSCANO,G.; BENATTI,G. y ZOCCARATO,I. (1986). Comparison of crude fiber and the Van Soest detergent methods for fiber determination in rabbit feeds. *Journal of Applied Rabbit Research*,9(2): 69-75.
- PARTRIDGE,I.G.; SIMON,D. y BERGNER,H. (1985). The passage and absorption of dietary and endogenous nitrogen in different regions of the digestive tract of rats given a single meal of ¹⁵N labelled barley. *Archiv. für Tierernährung*,35: 163-173.
- PENNEY,R.L.; FOLK,G.E.Jr; GALASK,R.P. y PETZOLD,C.R. (1986) The microflora of the alimentary tract of rabbits in relation to pH diet, and cold. *Journal of Applied Rabbit Research*,9(4): 152-156.
- PÉREZ, J.M. (1990). Prévision de l'énergie digestible des aliments pour le porc: intérêt du dosage des parois végétales par voie enzymatique. *INRA Production Animale*,3(3): 171-179.
- PÉREZ, J.M. (1994). Digestibilité et valeur energetique des luzernes deshydratées pour le lapin: influence de leur composition chimique et de leur technologie de preparation. 6^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole en France. INRA-ITAVI, La Rochelle. 6-7 déc.: 355-364.

- PÉREZ, J.M.; CERVERA, C.; FALCÃO E CUNHA, L.; MAERTENS, L.; VILLAMIDE, M.J. y XICCATO, G. (1995). European Ring-Test on *in vivo* digestibility performed with rabbits: Reproducibility of a reference method and comparison with individual laboratory procedures. *World Rabbit Science*, **3**(2) (en prensa).
- PÉREZ de AYALA, P. (1989). Utilización de distintos tipos de fibra por los conejos en cebo. Tesis Doctoral. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 115 pp.
- PÉREZ de AYALA, P.; FRAGA, M.J.; CARABAÑO, R. y DE BLAS, J.C. (1991). Effect of fiber source on diet digestibility and growth in fattening rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research*, **14**(3): 159-165.
- PICKARD, D.W. y STEVENS, C.E. (1972). Digesta flow through the rabbit large intestine. *American Journal of Physiology*, **222** (5): 1161-1166.
- POTE, L.M.; CHEEKE, P.R. y PATTON, N.M. (1980). Utilization of diets high in alfalfa meal by weanling rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research*, **3**(4): 5-10.
- PUSZTAI, A.; BEGBIE, R.; GRANT, G.; EWEN, S.W.B. y BARDOCZ, S. (1991). Indirect effects of food antinutrients on protein digestibility and nutritional value of diets. En: ***In vitro digestion for pigs and poultry***. M.F. Fuller (Editor), CAB International, Oxon, UK, pp:45-61.
- RAHARJO, Y.C., CHEEKE, P.R. y PATTON, N.M. (1990). Effect of cecotrophy on the nutrient digestibility of alfalfa and black locust leaves. *Journal of Applied Rabbit Research*, **13**(2): 56-61.
- RAMOS, M.; CARABAÑO, R. y BOISEN, S. (1992). An *in vitro* method for estimating digestibility in rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research*, **15**: 938-946.
- RATCLIFFE, B. (1991). The role of the microflora in digestion. En ***In Vitro Digestion for Pigs and Poultry***. M.F. Fuller (Editor), CAB. International, Oxon, U.K, pp:19-34.
- ROBERTSON, J.B. y VAN SOEST, P.J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. En: ***The Analysis of Dietary Fibre in Food***. (W.P.T. James & O. Theander, editors). Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. pp:123-158.
- ROBINSON, K.L.; CHEEKE, P.R. y PATTON, N.M. (1985). Effect of prevention of coprophagy on the digestibility of high forage and high concentrate diets by rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research*, **8**: 57-59.

- ROBINSON,K.L.; CHEEKE,P.R.; KELLY,J.D. y PATTON,N.M.(1986a). Effect of fine grinding and supplementation with hay on the digestibility of wheat bran by rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research*, **9**(4): 166-167.
- ROBINSON, K.L.; CHEEKE,P.R.; MATHIUS,I.W. y PATTON,N.M.(1986b). Effect of age and cecotrophy on urea utilization by rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research*, **9**: 76-79.
- RUCKEBUSCH,Y. y FIORAMONTY,J. (1976). Sur le determinisme de la caecotrophie chez le lapin. 1^{er} Congrès International Cunicole. Dijon (Francia). Communication n° 54.
- SAKAGUCHI, E. y HUME,I.D. (1990). Digesta retention time and fibre digestion in brushtail possums, ringtail possums and rabbits. *Comparative Biochemistry and Physiology*,**96**: 351-354.
- SAKAGUCHI,E.; HIROSHI, I.; UCHIDA,S. y HORIGOME,T. (1987). Comparison of fibre digestion and digesta retention time between rabbits, guinea-pigs, rats and hamsters. *British Journal of Nutrition*,**58**: 149-158.
- SAKAGUCHI,E.; KIYOSHI KAIZU y MIYUKI NAKAMICHI (1992). Fibre digestion and digesta retention from different physical forms of the feed in the rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology*,**102A** (3): 559-563.
- SAKAMOTO,K.; ASANO,T.; FURUYA,S. y TAKAHASHI,S. (1980). Estimation of *in vivo* digestibility with the laying hen by an *in vitro* method using the intestinal fluid of the pig. *British Journal of Nutrition*,**43**: 389-391.
- SAMBROOK,I.E. (1979). Studies on digestion and absorption in the Intestines of growing pigs. 8. Measurements of the flow of total lipid, acid-detergent fiber and volatile fatty acids. *British Journal of Nutrition*,**42**: 279-287.
- SAS Institute Inc. (1991). SAS System for Elementary Statistical Analysis. 3^a ed. SAS Institute Inc. Cary, NC 27513.
- SAS Institute Inc. (1991). SAS System for Linear Models. 3^a ed. SAS Institute Inc. Cary, NC 27513.
- SAUER,W.C.; MOSENTHIN,R.; AHRENS,F. y den HARTOG,L.A. (1991). The effect of source of fiber on ileal and fecal amino acid digestibility and bacterial nitrogen excretion in growing pigs. *Journal of Animal Science*,**69**: 4070-4077.
- SCHIEMANN,R.; NEHRING,K.; HOFFMANN,L.; JENTSCH,W. y CHUDY,A. (1972). Energetische futterbewertung und energienormen. *VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag*. Berlin. p. 72.

- SCHOLTYSSSEK, S. y SEIM, S. (1988). The energetic evaluation of rabbit feed using an *in vitro* method. *Arch. Geflügelk*, **52**(3): 103-111.
- SCHULZE, H.; van LEEUWEN, P.; VERSTEGEN, M.W.A.; HUISMAN, J.; SOUFFRANT, W.B. y AHRENS, F. (1994). Effect of level of dietary neutral detergent fiber on ileal apparent digestibility and ileal nitrogen losses in pigs. *Journal of Animal Science*, **72**: 2362-2368.
- SEMERTZAKIS, N. (1978). Utilization of non protein nitrogen by adult female rabbits for maintenance and during pregnancy. *Nutrition Abstracts and Reviews Series B*, **48B**: 198 (1548).
- SNEDECOR, G.W. y COCHRAN, W.G. (1971). Métodos estadísticos. C.E.C.S.A. 703pp.
- SPREADBURY, D. (1978). A study of the protein and amino acid requirements of the growing New Zealand White rabbit with emphasis on lysine and the sulphur-containing amino acids. *British Journal of Nutrition*, **39**: 601-613.
- SOUFFRANT, W.B. (1991). Endogenous nitrogen losses during digestion in pigs. En: **Digestive Physiology in Pigs**. Proc. of the Vth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs. Wageningen (Doorwerth), Netherlands. (EAAP Publication No.54).
- SOUFFRANT, W.B.; RÉRAT, A.; LAPLACE, J.P.; DARCY-VRILLON, B.; KÖHLER, R.; CORRIG, T. y GEBHARDT, G. (1993). Exogenous and endogenous contributions to nitrogen fluxes in the digestive tract of pigs fed a casein diet. III. Recycling of endogenous nitrogen. *Reproduction, Nutrition, Développement*, **33**: 373-382.
- STEPHENS, A.G. (1977). Digestibility and coprofagy in the growing rabbit. *Proceedings of the Nutrition Society*, **36**: 4A.
- TAVERNER, M.R.; HUME, I.D. y FARREL, D.J. (1981). Availability to pigs of amino acids in cereal grains. 1. Endogenous level of amino acids in ileal digesta and faeces of pigs given cereal diets. *British Journal of Nutrition*, **46**: 149-158.
- TILLEY, J.M.A. y TERRY, R.A. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*, **18**: 104-111.
- UDÉN, P. y VAN SOEST, P.J. (1982). The determination of digesta particle size in some herbivores. *Animal Feed Science and Technology*, **7**: 35-44.

- UDÉN,P., ROUNSAVILLE,T.R., WIGGANS,G.R. y VAN SOEST,P.J. (1982). The measurement of liquid and solid digesta retention in ruminants, equines and rabbits given timothy (*Phleum pratense*) hay. *British Journal of Nutrition*,**48**: 329-339.
- VALDÉS,E.V. y LEESON,S. (1992). Measurement of metabolizable energy in poultry feeds by an *in vitro* system. *Poultry Science*,**71**: 1493-1503.
- VAN DER MEER, J.M. (1984). CEC Workshop on Methodology of Feedingstuffs for Ruminants European *In vitro* Ring Test 1983. Statistical Report. Rapport I.V.V.O. nº 155.
- VAN DER MEER, J.M. y PÉREZ,J.M. (1992) *In vitro* evaluation of european diets for pigs. Prediction of the organic matter digestibility by an enzymatic method or by chemical analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,**59**: 359-363.
- VAN SOEST,P.J. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **46**: 829-835.
- VAN SOEST,P.J.; ROBERTSON,J.B. y LEWIS,B.A. (1991). Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral-detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*,**74**: 3583-3597.
- VERNAY,M. y MARTY,J. (1984). Absorption and metabolism of butyric acid in rabbit hind gut. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **77A**, nº1: 89-96.
- VERVAEKE,I.J.; DIERICK,N.A.; DEMEYER,D.I. y DECUYPERE,J.A. (1989). Approach to the energetic importance of fibre digestion in pigs. II. An experimental approach to hindgut digestion. *Animal Feed Science and Technology*,**23**: 169-194.
- VIALLARD,V. y RAYNAUD,P. (1968). Presence of a bacteriolytic agent in rabbit stomach contents. *Journal of Physiology*,**60**: 323-329.
- VILLAMIDE,M.J. (1989). Valor nutritivo de catorce alimentos en conejos. Tesis Doctoral. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 102 pp.
- WISEMAN,J.; VILLAMIDE,M.J.; DE BLAS,C. y CARABAÑO,R. (1992). Prediction of the digestible energy and digestibility of gross energy of feeds for rabbits. 1. Individual classes of feeds. *Animal Feed Science and Technology*,**39**: 27-38.

- WOLTER,R.; NOUWAKPO,F. y DURIX,A. (1980). Étude comparative de la digestion d'un aliment complet chez le pony et le lapin. *Reproduction, Nutrition, Développement*, **20**(5B): 1723-1730.
- WÜNSCHE,J.; HERRMANN,U.; MEINL,M.; HENNIG,U.; KREIENBRING,F. y ZWIERZ,P. (1987). Einfluß exogener Faktoren auf die präzäkale Nährstoff-und Aminosäurenresorption, ermittelt an Schweinen mit Ileo-Rektal-Anastomosen. 1. Mitt.: Einfluß des Zerkleinerungsgrades von Getreide. *Arch. Anim. Nutr.*, **37**: 745-764.
- XIA,X.Y. y HALL,D.D. (1987). *In vitro* digestibility of feedstuffs with ileal fluid from pigs. *Statens Husdyrbrugsforsøg. Meddelelse. NR. 682*.
- XICCATO,G.; COSSU,M.E.; CARAZZOLO,A.; CARABAÑO,R. y RAMOS,M. (1994). Evaluation *in vitro* de la valeur nutritive des aliments pour lapins. Efficacité de differents enzymes digestifs. 6^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole en France. INRA-ITAVI, La Rochelle. 6-7 déc.: 375-386.
- YU,B.; BION,P.W.S.; CHUNG-LIANG YOUNG y HWEI-HUARG HUANG. (1987). A study of rabbit T-type cannule and its ileal digestibilities. *Journal of the Chinese Society of Animal Science*, **16**: 3-4:
- ZAALBERG,J. (1989). Experimental design for inter-laboratory precision experiments: comparison of ISO 5725 with Draft NEN 6303. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **72**: 34-37.
- ZOIPOULUS,P.E.; TOPPS,J.H. y ENGLISH,P.R. (1983). Fibrous agri-industrial by-products as protein sources for bacon pigs. 2. Study of digestion with pigs cannulated at the terminal ileum. *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde*, **49**: 219-228.